

Alejandro Casanova Higes

Avances en la epidemiología de la salmonelosis porcina y estrategias de control asociadas

Director/es

Marín Alcala, Clara María
Mainar Jaime, Raúl Carlos

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

AVANCES EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA
SALMONELOSIS PORCINA Y ESTRATEGIAS DE
CONTROL ASOCIADAS

Autor

Alejandro Casanova Higes

Director/es

Marín Alcala, Clara María
Mainar Jaime, Raúl Carlos

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2019



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Avances en la epidemiología de la salmonelosis
porcina y estrategias de control asociadas

New insights into the epidemiology of pig
salmonellosis and associated control strategies

Autor

Alejandro Casanova Higes

Director/es

Raúl Carlos Mainar Jaime

Clara María Marín Alcalá

Facultad de Veterinaria

2019



Universidad
Zaragoza



TESIS DOCTORAL

Avances en la epidemiología de la salmonelosis porcina y
estrategias de control asociadas

New insights into the epidemiology of pig salmonellosis
and associated control strategies

Memoria presentada por

Alejandro Casanova Higes

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Zaragoza, 2019

A la memoria de mi Padre, Antonio
A mi Madre, María José, y a mi Hermano, Alberto

Como dijo Víctor Hugo: *“El futuro tiene muchos nombres: para los débiles es lo inalcanzable; para los temerosos es lo desconocido; para los valientes es la oportunidad”*.

INFORME DIRECTORES DE TESIS

D. RAÚL CARLOS MAINAR JAIME, Doctor en Veterinaria, con DNI 25.147.495-P, Profesor Contratado Doctor en el Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza, y D^a. CLARA MARÍA MARÍN ALCALÁ, Doctora en Veterinaria, con DNI 17.865.348-Y, Investigadora de la Unidad de Producción y Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA),

INFORMAN

Que D. Alejandro Casanova Higes, licenciado en Veterinaria por la Universidad de Zaragoza, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada *“Avances en la epidemiología de la salmonelosis porcina y medidas de control asociadas / New insights into the epidemiology of pig salmonellosis and associated control strategies”*, que se corresponde con el proyecto de Tesis aprobado por la Comisión de Doctorado y que cumple los requisitos exigidos para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizamos su presentación en la modalidad de compendio de publicaciones para que pueda ser juzgada por el Tribunal de Tesis correspondiente. A su vez, se autoriza la presentación de esta Tesis Doctoral con solicitud de Mención Internacional y Mención Industrial en el Título de Doctor de acuerdo al RD. 99/2011.

Lo hacemos constar como Directores del trabajo en Zaragoza, a 29 de abril de 2019.

Fdo: Raúl C. Mainar Jaime

Fdo: Clara M^a. Marín Alcalá

Saint Paul, October 17st 2017

To whom it may concern,

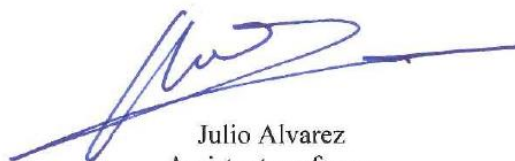
I hereby state that Dr. Alejandro Casanova Higes (DNI 76920972-W) has performed a training stay as part of his PhD studies funded by INIA (scholarship 2014-152) between May 21st and October 17st 2017. Alejandro has collaborated in several ongoing projects at the STEMMA laboratory in the Department of Veterinary Population Medicine of the University of Minnesota, with a focus on:

- The identification of spatio-temporal trends in the submission patterns of samples received at the Veterinary Diagnostic Laboratory of the UMN and from which *Salmonella* spp. was recovered, in order to evaluate if changes in antimicrobial use (such as the new veterinary feed directive that bans use of medically important antibiotics as growth promoters) can affect this patterns.
- Systematic review on antimicrobial resistance in *E.coli* of swine origin: to study both the phenotypic and genotypic prevalence of cephalosporin, fluoroquinolone and colistin resistance in *E. coli* isolated from pigs based on existing literature retrievable from major scientific databases.

Alejandro has always showed a great attitude during the work in the ongoing projects as well as volunteering during the A.D. Leman Swine Conference 2017 in St. Paul, Minnesota. It has been a pleasure hosting Alejandro and we are looking forward continuing our collaboration with him.

Please do not hesitate to contact me should you have further questions.

Sincerely



Julio Alvarez
Assistant professor
Veterinary Population Medicine Department
College of Veterinary Medicine
University of Minnesota
jalvarez@umn.edu



INFORME VALORACIÓN TESIS DOCTORAL / PhD THESIS ASSESSMENT REPORT

Doctoral Student: Alejandro Casanova Higes

Title of the Thesis: New insights into the epidemiology of pig salmonellosis and associated control strategies

D./D^a. Maria Madalena Vieira-Pinto

As external examiner of the PhD thesis (International or European Mention PhD of the Doctoral Committee that has evaluated the PhD thesis)

Emite el informe que sigue / issues the following report.

En Vila Real, a 12 de Abril de 2019.

Firma/Sign.: 

UTAD
Escola das Ciências
Laboratório de Veterinárias
ECAV

Evaluation Report. Discuss the originality and relevance of the work as well as the quality of the dissertation. You may include any comments that you want to send to the PhD student (please, attach as many pages as necessary).

The PhD thesis presented by Alejandro Casanova Higes is very well organised and presented. I was very pleasant to read it. The document proposed represents an important contribution for the study on new insights into the epidemiology of pig salmonellosis and associated control strategies.

The research study is very complete and exhaustive providing important information that will have great advance in the implementation of mitigation measures for *Salmonella*. Along this study it was identified two potential control strategies applicable in swine production to reduce *Salmonella* prevalence, namely the use of organic acids (OA) that should be seen as an alternative to antibiotics to reduce the burden of enteropathogens and the weaned piglets as a key factor for the control of *Salmonella* infection in breeding pig 1 farms. Also, the study focused on the use of serology in the context of control programs against pig salmonellosis, allowed to conclude that on-farm serology may help to determine to some extent the risk of *Salmonella* shedding at slaughter from seropositive fattening units, which would allow for prompt on-farm and slaughter interventions to reduce the likelihood of slaughter contamination with *Salmonella*.

Additionally, the research derived on the the risk of *Salmonella* shedding among pigs at slaughter with regard to their previous on-farm *Salmonella* status, concluded that a large proportion of *Salmonella* seronegative pigs may shed *Salmonella* at slaughter, which would be likely associated to previous exposure with contaminated environments (i.e. transport and lairage). Also, the authors underline that the odds of shedding *Salmonella* spp. were always much higher for pigs in which *Salmonella* was isolated from MLN. These results, allowed to advice the use of shorten periods of transport and lairage and good hygiene of truck and holding pens may help to prevent shedding.

As the PhD thesis shows, the results have already been published in important scientific journals in the field of food science. Also, the remaining results were already submitted for publication with a good publishing possibilities.

In accordance with the provisions of Regulation (EU) 2016/679 on Personal Data Protection, please be aware that your data will be added to the students' file, whose purpose is academic and administrative management, in addition to management of your participation in the services at the University of Zaragoza. You may exercise your right to access, rectify and cancel data may be exercised in writing to the Administrator.



INFORME VALORACIÓN TESIS DOCTORAL / PhD THESIS ASSESSMENT REPORT

Doctorando-a / Doctoral Student: Alejandro Casanova Higes

Título de la Tesis / Title of the Thesis:

"New insights into the epidemiology of pig salmonellosis and associated control strategies"

D./D^a. ...Ana Belen Vidal Gallego.....

☐ Como del Tribunal que ha juzgado la tesis doctoral / Asexternal examiner of the Doctoral Committee that has evaluated the PhD thesis

X Como evaluador de la tesis con mención de doctorado internacional o europea / As external examiner of the PhD thesis (International or European Mention PhD)

emite el informe que sigue / issues the following report.

En West Byfleet, a 03 de Mayo de 2019

Firma/Sign.:
(Without institution's official stamp)

Informe de Valoración para la Comisión de Doctorado / Evaluation Report.

Comente la originalidad del trabajo presentado, la relevancia del mismo dentro del dominio al que pertenece la tesis, la metodología y la calidad de la memoria presentada. Incluya, en su caso, los comentarios que desee hacer llegar al doctorando (adjunte las hojas que sean necesarias).

Discuss the originality and relevance of the work as well as the quality of the dissertation. You may include any comments that you want to send to the PhD student (please, attach as many pages as necessary).

To whom it may concern:

The thesis presented by Alejandro Casanova Higes deals with a highly topical question. *Salmonella* continues to be one of the most frequently implicated zoonotic agents in foodborne infections worldwide. Among many sources for human salmonellosis, contaminated pig meat poses a considerable burden on human health. As a consequence, many European countries have taken steps to control *Salmonella* in pig populations and put surveillance and control programmes into place. Research into the specific epidemiological characteristics of *Salmonella* in the Spanish national pig population is extremely important to be able to tailor the design of successful monitoring and control programmes.

The methodological approaches of the thesis are well designed and the investigations are scientifically sound. The results provide further insight into the epidemiology and control of *Salmonella* in pigs and highlight the usefulness of serological methods for the establishment of control programmes in the pig population that can contribute to improving food safety and consumer protection. The work also highlights the importance of lactating and weaning pigs in the transmission and spread of *Salmonella* within pig herds. The conclusions are well founded and the work has led to several peer-reviewed publications.

I would like to express my support for the thesis presented by Alejandro Casanova Higes, entitled "New insights into the epidemiology of pig salmonellosis and associated control strategies" to receive the "European Mention PhD" degree.

Kind regards,

Ana Vidal BVetSc MSc (Vet Epi), PhD
Antimicrobial resistance surveillance and policy team
Veterinary Medicines Directorate (Department for Environment, Food and Rural Affairs)
United Kingdom

In accordance with the provisions of Regulation (EU) 2016/679 on Personal Data Protection, please be aware that your data will be added to the students' file, whose purpose is academic and administrative management, in addition to management of your participation in the services at the University of Zaragoza. You may exercise your right to access, rectify and cancel data may be exercised in writing to the Administrator.

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA-Aragón). El Doctorando ha sido el receptor de una beca Pre-Doctoral del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (FPI-INIA 2014-152) en el marco del proyecto de investigación titulado “*Control de la salmonellosis porcina en cebadero: papel de los lechones como transmisores de la infección y eficacia de la adición de algunos extractos naturales de plantas al pienso*” (RTA-INIA 2012-24).

Esta Tesis Doctoral está constituida por el compendio de 5 trabajos de investigación previamente publicados y/o en proceso de publicación en diversas revistas científicas de carácter internacional, que se presentan a continuación:

- **Publicación I:** Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C., 2017. Influence of on-farm pig *Salmonella* status on *Salmonella* shedding at slaughter. Zoonoses and Public Health, 64(5):328-336. doi: 10.1111/zph.12301.
- **Publicación II:** Mainar-Jaime, R.C., Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., 2018. Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programs against pig salmonellosis. Zoonoses and Public Health, 65(1):e222-e228 doi: 10.1111/zph.12432.
- **Publicación III:** Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C., 2017. Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigs. Animal Feed Science and Technology, 231:12-18. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.06.008.
- **Publicación IV:** Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C., 2018. Use of a new form of protected sodium butyrate to control *Salmonella* infection in fattening pigs. Spanish Journal of Agricultural Research, 16(4):e05SC02. doi: 10.5424/sjar/2018164-13888.
- **Publicación V:** Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M., Andrés-Barranco, S., Cebollada-Solanas, A., Álvarez, J., Mainar-Jaime, R.C., 2019. Weaned piglets: another key factor for the control of *Salmonella* infection in breeding pig farms. Veterinary Research (en revisión).

AVAL DE BIENESTAR ANIMAL

D. RAÚL CARLOS MAINAR JAIME, Doctor en Veterinaria, con DNI 25.147.495-P, Profesor Contratado Doctor en el Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza, y D^a. CLARA MARÍA MARÍN ALCALÁ, Doctora en Veterinaria, con DNI 17.865.348-Y, Investigadora de la Unidad de Producción y Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA), como Directores de la presente Tesis Doctoral,

INFORMAN

Que todos los procedimientos con animales realizados en este trabajo de Tesis Doctoral han formado parte de las prácticas veterinarias habituales llevadas a cabo en las explotaciones porcinas comerciales, por lo que no ha sido necesaria la autorización previa por parte de la Comisión Ética Asesora de la Experimentación Animal (CEAEA) de la Universidad de Zaragoza.

Lo hacemos constar en Zaragoza, a 29 de abril de 2019.

Fdo: Raúl C. Mainar Jaime

Fdo: Clara M^a. Marín Alcalá

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	v
I. RESUMEN	1
I. SUMMARY	7
II. INTRODUCCIÓN	13
1. Género <i>Salmonella</i>	15
1.1. Características generales.....	15
1.2. Taxonomía y nomenclatura.....	15
2. Metodología	17
2.1. Técnicas de diagnóstico de <i>Salmonella</i> utilizadas.....	20
2.1.1. Cultivo microbiológico.....	20
2.1.2. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (ELISA)	23
2.2. Técnicas de caracterización de <i>Salmonella</i> utilizadas.....	24
2.2.1. Serotipificación.....	24
2.2.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	24
3. El sector porcino en España	25
4. La importancia de la salmonelosis en Salud Pública	28
4.1. En la Unión Europea	28
4.2. En España	29
5. Papel del cerdo en la salmonelosis humana	32
6. La infección por <i>Salmonella</i> en el cerdo	35
6.1. Dinámica de infección en el animal.....	35
6.2. Epidemiología de <i>Salmonella</i> en las explotaciones porcinas	37
6.2.1. Cebo	37
6.2.2. Transición	38
6.2.3. Cerdas reproductoras.....	38
6.2.4. Lactación	39
7. Estrategias de control de la infección	41
7.1. Higiene y Bioseguridad.....	41
7.2. Vacunación	43
7.3. Estrategias de alimentación	45
7.3.1. Ácidos orgánicos.....	47
8. El control de <i>Salmonella</i> en porcino en la UE	51

8.1. Programas nacionales de control de <i>Salmonella</i> en porcino en la UE.....	55
8.1.1. Dinamarca	55
8.1.2. Irlanda	56
8.1.3. Austria	56
8.1.4. Alemania.....	57
8.1.5. Reino Unido.....	58
8.1.6. Holanda	58
8.1.7. Bélgica	59
8.1.8. España	60
III. OBJETIVOS	63
IV. TRABAJOS PUBLICADOS	67
Publicación I / Publication I	69
Publicación II / Publication II	81
Publicación III / Publication III	91
Publicación IV / Publication IV	101
Publicación V / Publication V	109
V. CONSIDERACIONES FINALES	137
VI. CONCLUSIONES	145
VI. CONCLUSIONS	149
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	153
VIII. ANEXOS	177
I. Protocolo de la técnica PGFE.....	179
IX. APÉNDICES.....	181
1. Características de las revistas científicas	183
2. Contribuciones del Doctorando	185
3. Otras contribuciones científicas.....	187
4. Renuncia de los coautores de los trabajos presentados.....	193
AGRADECIMIENTOS.....	195

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.1: Esquema actual de la clasificación del género <i>Salmonella</i> * (Issenhuth-Jeanjean <i>et al.</i> , 2014)	16
Figura.2: Esquema de las etapas del cultivo microbiológico de <i>Salmonella</i> de acuerdo a la Norma EN ISO 6579:2002/Amd1:2007	22
Figura.3: Evolución del censo porcino (millones de animales) en los principales países productores de la Unión Europea (MAPAMA, 2018b; MAPA, 2019a)	25
Figura.4: Distribución (%) de los principales países productores de carne de cerdo de la Unión Europea durante el año 2018 (EUROSTAT, 2019)	26
Figura.5: Evolución del número de casos confirmados de salmonelosis no tifoidea y de la tasa de notificación en humanos dentro de la Unión Europea entre 2005-2017 (EFSA, 2018)	29
Figura.6: Evolución del número total de casos confirmados de salmonelosis no tifoidea en humanos (EFSA, 2018) y de los principales serotipos de <i>Salmonella</i> (RENAVE, 2018) durante el periodo 2005-2016 en España	30
Figura.7: Representación esquemática del mecanismo de acción de un ácido orgánico (ácido fórmico) frente a una bacteria de <i>Salmonella</i>	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla.1: Resumen de la interpretación y resultados de las pruebas bioquímicas sobre colonias sospechosas de <i>Salmonella</i>	23
Tabla.2: Principales muestras de alimentos de origen animal contaminadas por <i>Salmonella</i> en España (MAPAMA, 2018a) y en la Unión Europea (EFSA, 2017a) en el año 2016	32

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
BGA	<i>Brilliant Green Agar</i> /Medio agar verde brillante.
BPW	<i>Buffered peptone water</i> /Agua de peptona tamponada.
CCAA	Comunidades Autónomas.
CE	Comisión Europea.
CG/GC	<i>Control group</i> /Grupo Control.
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
DIVA	<i>Differentiation of Infected and Vaccinated Animals</i> /Diferenciación de animales infectados y vacunados.
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> /Agencia Europea de Seguridad Alimentaria.
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> /Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.
EU/UE	<i>European Union</i> /Unión Europea.
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> /Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FOS	Fructo-oligosacáridos.
GOS	Galacto-oligosacáridos.
IC	Intervalo de confianza.
IgG	Inmunoglobulina G.
ISO	<i>International Standard Organization</i> /Organización Internacional de Normalización.
LDC	Lisina descarboxilasa.
LNRSA	Laboratorio Nacional de Referencia para la Salmonelosis Animal.
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España.
MAPAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España.
MLN/NLM	<i>Mesenteric lymph nodes</i> /Nódulos linfáticos mesentéricos.
MLVA	<i>Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis</i> /Análisis de Variabilidad de secuencias de Locus múltiple.
MOS	Manano-oligosacáridos.

MSRV	<i>Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis</i> /Medio semisólido de Rappaport-Vassiliadis modificado.
OA/AO	<i>Organic acids</i> /ácidos orgánicos.
OD/DO	<i>Optical density</i> /Densidad óptica.
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> /Reacción en cadena de la polimerasa.
PFGE	<i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> /Electroforesis en gel de campo pulsado.
PSP	Programa de control de <i>Salmonella</i> en Porcino.
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
RTE	<i>Ready to eat</i> /Listos para consumo.
SCFA	<i>Short chain fatty acids</i> /Ácidos grasos de cadena corta.
SIM	Sistema de Información Microbiológica.
TG/GT	<i>Treatment group</i> /Grupo tratamiento.
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i> /Medio triple hierro azúcar.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i> /Número variable de repeticiones en tándem.
WGS	<i>Whole Genome Sequence</i> /Secuencia genómica completa.
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> /Organización Mundial de la Salud.
XLD	<i>Xylose Lysine Deoxycholate agar</i> /Medio agar de xilosa lisina desoxicolato.
ZAP	<i>Zoonoses Action Plan</i> .
ZNCP	<i>Zoonoses National Control Programme</i> .

I. RESUMEN

La salmonelosis no tifoidea es la segunda zoonosis transmitida por alimentos más importante en la Unión Europea (UE). El ganado porcino es, tras la avicultura, la segunda fuente de infección más importante, existiendo una relación directa entre el consumo de carne de cerdo contaminada por *Salmonella* y la infección en humanos. Teniendo en cuenta que España es a la vez el país con mayor prevalencia de salmonelosis porcina y el segundo productor de carne de cerdo de la UE, el control de la infección por *Salmonella* a lo largo de la cadena de producción porcina debe ser una obligación para un país que exporta más de la mitad (51%) de la carne de cerdo que produce (MAPAMA, 2018b).

El estudio de la epidemiología de la salmonelosis porcina en la explotación es fundamental para conocer los factores de riesgo y poder aplicar las medidas preventivas correspondientes para su control efectivo. La contaminación por *Salmonella* de las canales de cerdo en el matadero, procedente mayoritariamente de la excreción de la bacteria por los animales que llegan para sacrificio, es uno de los principales factores de riesgo en la contaminación de la carne y la consiguiente infección de las personas. Así, con el primer artículo de esta Tesis Doctoral (**Publicación I: *Influence of on-farm pig Salmonella status on Salmonella shedding at slaughter***) se trata de esclarecer la posible relación entre el estatus serológico frente a *Salmonella* de los cerdos en la fase final del ciclo de producción (cebo) y la excreción de *Salmonella* de los animales una vez llegan al matadero. Para ello se obtuvieron muestras serológicas de 202 cerdos a lo largo del periodo de cebo junto con muestras de nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) y de heces en el sacrificio. Ello nos permitió estudiar la dinámica natural de la infección por *Salmonella* en el cerdo durante la fase de cebo y hasta llegar al matadero. Se observó que los cerdos que excretaban *Salmonella* en el matadero habían seroconvertido antes durante la fase de cebo, mostrando unos valores serológicos al llegar al matadero significativamente más elevados que los cerdos que no excretaron *Salmonella*, estableciendo una relación positiva entre el estatus serológico frente a la infección en la granja y la excreción en el matadero. Sin embargo, una proporción importante (26,1%) de cerdos seronegativos durante el cebo y sin detección de la bacteria en NLM acabaron excretando *Salmonella* en el matadero, lo que podría estar relacionado con la exposición de los cerdos a ambientes muy contaminados por *Salmonella* (el camión de transporte y los establos del matadero). Por otra parte, el riesgo de excreción de *Salmonella* en el matadero fue significativamente superior en aquellos cerdos en los que se aisló la bacteria en NLM ($P < 0,01$), por lo que la presencia de *Salmonella* a nivel de NLM se consideraría como un factor de riesgo para su excreción en el matadero.

Entender la posible relación entre el estatus serológico de los cerdos durante el cebo y la excreción de *Salmonella* en el matadero abriría la puerta a nuevas estrategias de control de la infección dentro de los denominados Programas Nacionales de Control de la Salmonelosis Porcina. Desde 1995 se han puesto en marcha en diferentes países europeos planes nacionales con el objetivo de disminuir la prevalencia de infección de *Salmonella* en las explotaciones porcinas, pero a excepción de los países escandinavos, los resultados obtenidos no parecen haber sido satisfactorios en la mayoría de los países donde se han llevado a cabo. Esta problemática se aborda en la **Publicación II (*Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis*)** donde, basándonos en los resultados del primer artículo y en un estudio más detallado de la relación entre serología frente a *Salmonella* en la explotación y la excreción en matadero, se plantea un nuevo enfoque para estos programas. Este enfoque se centra en evitar en lo posible la contaminación del matadero tras predecir el riesgo de excreción de *Salmonella* que presentan los animales que llegan al mismo. Ello permitiría aplicar con suficiente antelación (tanto los días previos en la granja como durante su estancia en los establos del matadero) posibles medidas que redujeran la excreción y por lo tanto la consiguiente contaminación del matadero. Para este trabajo se analizaron muestras de suero de 6 lotes de cerdos cebados entre 2010 y 2016. Los sueros se recogieron a los 30, 60 y 90 días del periodo de cebo y antes del sacrificio. En el matadero también se recolectaron muestras de heces de los mismos animales. Se encontró una relación significativa positiva entre los valores serológicos a los 60, 90 días y antes del sacrificio y la excreción de *Salmonella* en matadero. Los cerdos con valores serológicos más elevados en esos momentos del muestreo tuvieron mayor riesgo de excretar la bacteria al llegar al matadero. Un cerdo muestreado a los 90 días del periodo de cebo con un porcentaje de densidad óptica (%DO) igual a 10 presentó una probabilidad del 43% de excretar la bacteria. Esta probabilidad se incrementaba hasta el 65% para un cerdo con un %DO=40. Por lo tanto, la serología en la explotación podría ayudar a predecir la probabilidad de excreción de *Salmonella* en el matadero, convirtiéndose en una herramienta de diagnóstico eficaz.

Tras quedar patente la importancia del estatus sanitario frente a *Salmonella* de los cerdos durante el periodo de cebo, parecía evidente la necesidad de evaluar posibles estrategias de control de la infección durante esta etapa. Aunque tradicionalmente el control de las infecciones entéricas se ha llevado a cabo mediante el uso de antibióticos (bien como terapéuticos, metafilácticos o como promotores del crecimiento), el aumento de las resistencias a los antimicrobianos impide su uso generalizado en estas fases finales de producción, siendo necesaria la búsqueda de alternativas.

A la gran variedad de aditivos con efecto antimicrobiano *in vitro* autorizados por la UE, se une la diversidad de protocolos de actuación y dosificación existentes, por lo que en ocasiones puede resultar complicada la elección de una pauta de administración idónea. De entre todos ellos, los ácidos orgánicos (AO) han sido uno de los más estudiados debido a su patente efecto antimicrobiano *in vitro*. Por este motivo, en las dos publicaciones siguientes se evalúa la eficacia *in vivo* de la administración al pienso de cebo de un AO, el butirato sódico, que ya ha demostrado con anterioridad su eficacia *in vitro* frente a *Salmonella*. Para este estudio se realizaron varios ensayos de campo en un cebadero comercial de pequeño tamaño (≈ 100 animales distribuidos en 8 cuadras). La mitad de los animales recibieron pienso adicionado con butirato sódico (grupo tratamiento –GT–) durante toda la fase de cebo (aproximadamente 3,5 meses) y la otra mitad consumieron el mismo pienso sin el aditivo (grupo control –GC–). Se obtuvieron muestras de heces y suero de los cerdos de los dos grupos de forma periódica y durante todo el periodo de tratamiento. Tras el sacrificio se recogieron también muestras de heces y de NLM en el matadero.

En el primer ensayo (**Publicación III: *Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on Salmonella spp. infection dynamics in fattening pigs***), se realizaron dos réplicas y se evaluó la eficacia del butirato sódico protegido a base de una grasa vegetal (GUSTOR BP70®, Norel S.A., Madrid, Spain) y administrado a una concentración de 3 kg/t de pienso. Cuando los resultados de las dos réplicas se analizaron en conjunto, se observó en el GC un aumento significativo del riesgo de excreción a los 90 días de cebo y una vez en el matadero. También se detectó una tendencia descendente significativa de los valores serológicos en el GT y, por lo tanto, de la seroprevalencia en fechas previas al sacrificio.

El segundo ensayo, de una sola réplica, se presenta en la **Publicación IV (*Use of a new form of protected sodium butyrate to control Salmonella infection in fattening pigs*)**, donde se evaluó la eficacia del mismo butirato sódico pero encapsulado de forma diferente, con una fórmula de ácidos grasos destilados de coco (DICOSAN +®, Norel S.A., Madrid, Spain). Se administró a la misma concentración que en el ensayo anterior (3 kg/t) durante los 3,5 meses de duración del periodo de cebo. Los resultados este ensayo mostraron una reducción significativa en el número de cerdos infectados (61% vs. 4%; $P < 0,01$) y en los valores serológicos en el momento del sacrificio en el GT comparado con el GC (%DO=55,9% vs. %DO=19,4%; $P < 0,01$).

La realización de estos dos ensayos ha permitido obtener interesantes resultados sobre la eficacia del uso de butirato sódico de cara a poder utilizarlo como alternativa a los antimicrobianos para el control de la infección y excreción por *Salmonella* en los cerdos de cebo.

La última parte de este trabajo de Tesis Doctoral se dedica a estudiar una de las grandes lagunas existentes en la epidemiología de la salmonelosis porcina: la infección en los lechones lactantes. La información acerca de la epidemiología de la infección por *Salmonella* en condiciones de campo durante esta etapa del ciclo productivo es escasa, principalmente debido a la complejidad y coste de los ensayos a realizar, al ser necesario el sacrificio de un gran número de animales jóvenes para disponer de datos precisos de prevalencia de infección. Por esta razón, los estudios realizados hasta el momento se han llevado a cabo mayoritariamente mediante técnicas poco sensibles para la detección de *Salmonella* (muestreos fecales mediante uso de hisopos rectales), posiblemente infra estimando los resultados de prevalencia reales.

En la **Publicación V (*Weaned piglets: another key factor for the control of Salmonella infection in breeding pig farms*)** se aborda este estudio aprovechando la disponibilidad de lechones de 4 semanas de vida sacrificados en un matadero comercial. De esta manera se disponía de diferentes tipos de muestras (contenido intestinal, NLM y músculo diafragmático) que permitieron un estudio más exhaustivo de cada animal analizado. Se observó que la prevalencia de infección y excreción en lechones fue elevada ($\approx 36\%$), muy superior a lo publicado en estudios previos, sugiriendo que los lechones desempeñaban un papel activo en el mantenimiento de *Salmonella* en las explotaciones. También se observaron valores serológicos significativamente más altos en lechones no infectados que en lechones infectados (valores medios de %DO de 17,3 vs. 12,0; respectivamente; $P=0.002$), lo que indicaba un posible efecto protector del calostro frente a la infección. El 75% de las cepas de lechones analizadas estaban genéticamente relacionadas con cepas aisladas de cerdas de la misma explotación, sugiriendo una activa circulación de cepas de *Salmonella* entre cerdas y lechones. Se concluyó que la mejora de la calidad del calostro y de su ingesta por parte de los lechones, junto con la reducción de la excreción en las cerdas, ayudaría a controlar la infección por *Salmonella* en las granjas de producción.

I. SUMMARY

Non-typhoidal salmonellosis is the second most important zoonosis in the European Union. Pork is, after poultry, the second most important source of infection, with a direct relationship between the consumption of *Salmonella*-contaminated pork and human salmonellosis. Bearing in mind that Spain presents the highest prevalence of *Salmonella* infection in pigs and is the second pork producer in the EU, exporting more than half (51%) of its meat production (MAPAMA, 2018b), the control of this infection all along the pig production chain is of utmost interest.

The study of the epidemiology of *Salmonella* in pigs is needed to know the risk factors and to apply effective preventative measures to control the infection. *Salmonella* pig carcass contamination at the slaughterhouse, mainly coming from *Salmonella*-shedding pigs arriving to the slaughterhouse, is one of the main risk factors for *Salmonella* pork contamination and subsequent human infections. Therefore, the first publication of this PhD Thesis (**Publication I: *Influence of on-farm pig Salmonella status on Salmonella shedding at slaughter***) tries to clarify the relationship between the *Salmonella* serological status in fattening pigs and *Salmonella* shedding in pigs once they have arrive to the slaughterhouse. For this purpose, 202 pigs that had been serologically monitored monthly during the fattening period, and from which mesenteric lymph nodes (MLN) and faecal samples were collected at slaughter for *Salmonella* isolation, were included in this study. This allowed studying the natural dynamic of *Salmonella* infection in pigs during the fattening period and the slaughter. It was observed that pigs shedding *Salmonella* at slaughter seroconverted much earlier during the fattening period and showed much higher ELISA values at slaughter than non-shedders pigs, establishing a positive relationship between on-farm serological status and *Salmonella* shedding at slaughter. However, a significant proportion (26.1%) of seronegative pigs during the fattening period and without *Salmonella* isolation at MLN ended up shedding *Salmonella* at slaughter, which could be related to the exposure of the pigs to heavily *Salmonella*-contaminated environments (i.e. the transport truck and lairage). On the other hand, the risk of shedding *Salmonella* at slaughterhouse was significantly higher in those pigs in which the bacteria were isolated in MLN ($P<0.01$), so the presence of *Salmonella* at the MLN level would be considered as a risk factor for its shedding at slaughterhouse.

Understanding the likely relationship between the *Salmonella* serological status in pigs during the fattening period and the *Salmonella* shedding at slaughter would open the door to new control strategies on *Salmonella* infection within the so-called National Swine Salmonellosis Control Programmes. Since 1995, these National Programmes have been initiated in different European countries with the aim of reducing the prevalence of *Salmonella* infection in pig farms.

However, with the exception of the Scandinavian countries, the results obtained do not seem to have been satisfactory in most of the countries where they were established.

This topic is investigated in the **Publication II (*Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis*)**. Based on the first Research Article and on a more comprehensive study into the relationship between on-farm *Salmonella* serology and *Salmonella* shedding at slaughterhouse, a new approach for the National Programmes is proposed. This approach focuses on avoiding as much as possible the *Salmonella* contamination of the slaughterhouse after predicting the risk of *Salmonella* shedding presented by the pigs. This would allow applying for prompt interventions (both, the previous days at the farm and during the lairage) to reduce the *Salmonella* shedding and, therefore, the subsequent *Salmonella* contamination. Serum samples from six batches of fattening pigs were analyzed between 2010 and 2016. Sera were collected at 30, 60 and 90 days on fattening and before slaughter. At slaughterhouse, fecal samples from the same pigs were also collected. A significant positive relationship was found between ELISA values at 60, 90 days and before slaughter and the *Salmonella* shedding at the slaughter. Pigs with higher ELISA values at those sampling times had a higher risk of shedding the bacteria upon arrival at the slaughterhouse. The probability of shedding *Salmonella* for a pig sampled on day 90 that showed an optical density percentage (OD%) value of 10 was 43%. This probability increased up to 65% for a pig with an OD% value of 40. Therefore, it seemed that on-farm serology could help to predict the probability of *Salmonella* shedding at slaughter and could be an effective diagnostic tool.

After the importance of *Salmonella* status in pigs during the fattening period was clarified, a search for control strategies during this production phase was needed. Although the control of enteric infections has been traditionally done through the use of antibiotics (either as therapeutic, metaphylactic or as growth promoters), the increase of antimicrobial resistance prevents their widespread use in this final stage of pig production, being necessary looking for alternatives.

In addition to the great variety of EU-authorized feed additives with *in vitro* antimicrobial effect, there is also a large diversity of existing protocols and dosage that could be applied, which can sometimes complicate the choice of the product to use. Among all of them, organic acids (OA) have been one of the most studied due to their evident antimicrobial effect *in vitro*. Thus, the following two publications assess the *in vivo* efficacy of the administration of an organic acid, sodium butyrate, to the feed of fattening pigs. This OA has already demonstrated its *in vitro* efficacy against *Salmonella*. Two studies were carried out on a small (≈ 100 pigs/8 pens) fattening

unit. Feed with sodium butyrate was administered to animals from 4 randomly selected pens (treatment group –TG–) during the fattening period (≈3.5 months) and the remaining 4 pens were fed with the same basal diet without sodium butyrate (control group –CG–). Serum and fecal samples from both groups were collected monthly on the fattening period. Fecal samples and MLN were collected at slaughterhouse.

In the first study (**Publication III: *Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on Salmonella spp. infection dynamics in fattening pigs***) two replicates were performed and the efficacy of a sodium butyrate protected with vegetable fats (GUSTOR BP70®, Norel S.A., Madrid, Spain) administered at a concentration of 3 kg/T of feed was assessed. When results from both replicates were analyzed together, a significant increase in the risk of shedding *Salmonella* was observed in the CG at 90 days of fattening and once at slaughter. An overall significant decreasing trend in ELISA values in the TG was observed during the fattening period and when pigs arrived to slaughter.

The second study, with one replicate, is presented in **Publication IV (*Use of a new form of protected sodium butyrate to control Salmonella infection in fattening pigs*)**. The efficacy of the same sodium butyrate but encapsulated with a sodium salt of coconut fatty acid distillate (DICOSAN +®, Norel S.A., Madrid, Spain) was assessed. The same dosage (3 kg/T) as before was administrated during the fattening period (3.5 months). A significant reduction in the number of infected pigs (61% vs. 4%; $P<0.01$) and in the median ELISA values at slaughter was observed in pigs from TG compared to pigs from CG (OD%=55.9% vs. OD%=19.4%; $P<0.01$).

Therefore, performing these two studies allowed obtaining promising results on the efficacy of the use of sodium butyrate as an alternative to antimicrobials for the control of the *Salmonella* infection and shedding in fattening pigs.

The last part of this PhD Thesis is devoted to study one of the major gaps in the epidemiology of pig salmonellosis: the infection in suckling piglets. Data on the epidemiology of *Salmonella* infection at this stage of the pig production under field conditions is scarce, mainly due to the complexity and the cost of the trials to be carried out, as it would be necessary to slaughter a large number of young animals in order to have precise data on the prevalence of infection. For this reason, previous studies have been mainly carried out using low-sensitive techniques for the detection of *Salmonella* (fecal samplings mainly through rectal swabs) possibly under estimating the real prevalence of infection.

In **Publication V (*Weaned piglets: another key factor for the control of Salmonella infection in breeding pig farms*)** we took advantage of the availability of 4-weeks-old piglets

slaughtered in a commercial slaughterhouse to assess the prevalence of *Salmonella* infection. Thus, fecal content, MLN and diaphragmatic muscle samples were collected to perform a more comprehensive study of each slaughtered piglet. The overall prevalence of *Salmonella* infection and shedding was similar and high ($\approx 36\%$), higher than that published in previous studies, and suggesting that piglets played an active role in the maintenance of on-farm *Salmonella*. Significant higher ELISA values were found in non-infected piglets compared to infected ones (median OD% of 17.3 and 12.0, respectively; $P=0.002$) suggesting some protective effect of sow's colostrum. Pulsed field gel electrophoresis analyses showed that 75% of the piglet isolates were genetically related to isolates from sows from the same farm, suggesting an active circulation of *Salmonella* strains between sows and piglets. It was concluded that improving both colostrum quality and its intake by piglets, along with reducing sow *Salmonella* shedding, may help to control *Salmonella* infection in breeding farms.

II. INTRODUCCIÓN

1. Género *Salmonella*

1.1. Características generales

El primer aislamiento conocido de la bacteria *Salmonella* se remonta al año 1886, cuando el veterinario estadounidense Daniel Elmer Salmon, junto con su asistente, el epidemiólogo y patólogo estadounidense Theobald Smith, la aislaron en cerdos creyendo que era la causa de la peste porcina (Schultz, 2008). Sin embargo, la denominación del género *Salmonella* se debe al bacteriólogo francés Joseph Marcel Lignières, quien sugirió en 1900 la creación de este género en honor a sus descubridores. Desde entonces, debido a la complejidad de su nomenclatura, la clasificación de este género ha estado en constante evolución.

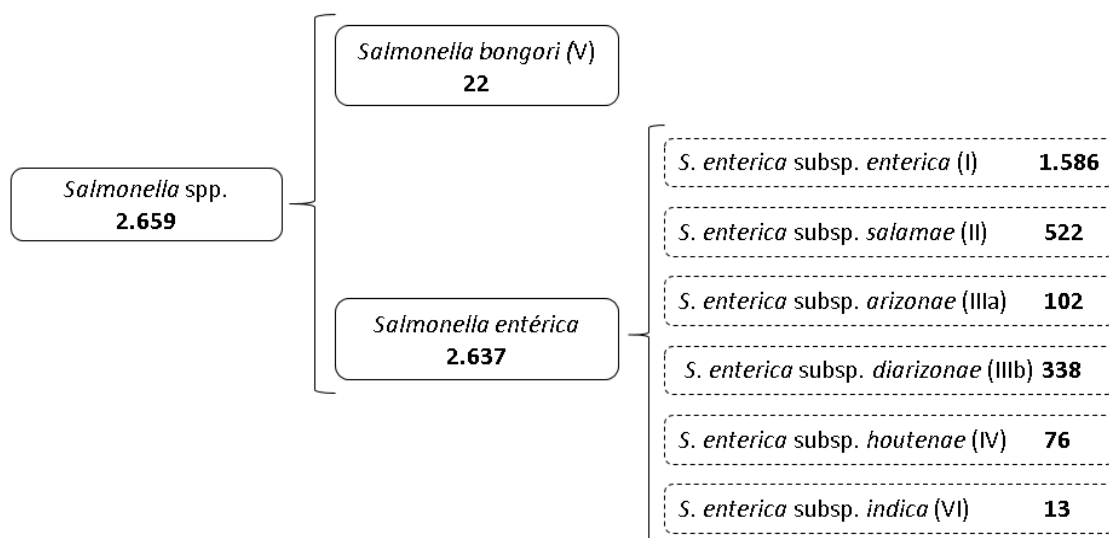
Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen al Orden *Enterobacteriales*, Familia *Enterobacteriaceae* (Strockbine *et al.*, 2015). Las bacterias de este género se caracterizan por ser Gram negativas, con forma bacilar, anaerobias facultativas que no producen esporos ni cápsulas (a excepción de *S. Typhi*, *S. Paratyphi* y *S. Dublin*) (Rycroft, 2013), y con motilidad debido a la presencia de flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum* y otras variantes inmóviles por ausencia de flagelos asociadas con la infección en aves) (Shivaprasad *et al.*, 2013).

Son bacterias capaces de crecer en medios de cultivo en el laboratorio en un rango de temperatura entre 7 °C y 47 °C, siendo los 35 °C-37 °C su temperatura óptima de crecimiento (Wales *et al.*, 2013). Por debajo de 7 °C no se multiplican, pero pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo, incluso en alimentos congelados. Temperaturas superiores a 55 °C inactivan la bacteria (Giaccone *et al.*, 2012), por lo que los procesos de pasteurización impiden la posible contaminación de los alimentos con *Salmonella*. Estos microorganismos son resistentes a la desecación, pero requieren de una actividad de agua superior a 0,940 para su multiplicación. Pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el polvo y sobre materia orgánica, pero son sensibles a los desinfectantes utilizados habitualmente en la limpieza y desinfección (fenoles, iodados y clorados) de las explotaciones ganaderas, resultando de utilidad para la inactivación de la bacteria.

1.2. Taxonomía y nomenclatura

El género *Salmonella* está formado por dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (V) clasificadas a su vez en varias subespecies (Figura 1). *Salmonella enterica* se subdivide en seis subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subsp. *indica* (VI).

Figura 1. Esquema actual de la clasificación del género *Salmonella** (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014).



*Las cifras indican el número de serotipos.

Aunque *Salmonella* se caracteriza por su gran supervivencia en el medio ambiente, su hábitat natural es el tracto digestivo de la mayoría de animales vertebrados y humanos (Stevens *et al.*, 2013). Entre todas las subespecies cabe destacar *S. enterica* subsp. *enterica*, ya que agrupa la mayoría de serotipos de *Salmonella* patógenos para el ser humano y animales domésticos (Figura 1). Entre ellos se encuentran *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi A, B y C, adaptados al ser humano y causantes de las fiebres tifoideas y paratifoideas, respectivamente. Dentro de la subespecie *enterica* también se incluyen numerosos serotipos no tifoideos que pueden infectar a un amplio rango de animales (incluido el ser humano) y causantes de gastroenteritis principalmente (*S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, etc.), y serotipos específicos de ciertos hospedadores, como *S. Gallinarum* (aves), *S. Abortusovis* (ovino), *S. Choleraesuis* (porcino) y *S. Dublin* (vacuno) (Stevens *et al.*, 2013).

2. Metodología

El diagnóstico de la infección de un animal puede llevarse a cabo bien mediante técnicas de diagnóstico directo (por aislamiento e identificación del agente causal) o mediante técnicas de diagnóstico indirecto (a través de la detección de la respuesta inmune frente a la infección del animal enfermo).

El cultivo microbiológico es la técnica de referencia para la detección de *Salmonella* en el cerdo, al considerarse una prueba 100% específica por tener una etapa de confirmación de colonias sospechosas. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica es inferior al 100% (Wilkins *et al.*, 2010; EFSA, 2011) al verse afectada por diversos factores:

I) Diferentes protocolos de diagnóstico: existe una gran variedad de medios de cultivo para la detección de *Salmonella* (Waltman, 2000). En general, y con el fin de aumentar la sensibilidad de la bacteriología, se suelen utilizar una combinación de varios de ellos. Se ha observado que los diferentes protocolos de cultivo utilizados pueden hacer variar la sensibilidad de la técnica (Rostagno *et al.*, 2005; Love *et al.*, 2008), complicando la comparación de resultados.

II) Tipo de muestra: para el análisis microbiológico de *Salmonella* en porcino, suelen usarse dos tipos de muestras principalmente: muestras de contenido fecal del intestino (heces) para analizar la excreción de la bacteria, y nódulos linfáticos para el estudio de la infección. Además, se utilizan muestras ambientales en las granjas y de superficie de las canales para conocer la contaminación por *Salmonella*. La flora competitiva junto con otras sustancias inhibitorias presente en las heces y en las muestras ambientales puede interferir en las etapas del cultivo microbiológico, por ello se considera que la bacteriología a partir de nódulos linfáticos presenta mayor sensibilidad (EFSA, 2006).

III) Tamaño de la muestra analizada: la cantidad de muestra utilizada también afecta a la sensibilidad de la bacteriología (Hurd *et al.*, 1999; Funk *et al.*, 2000; Sangvatanakul, 2007). Se ha descrito que la sensibilidad sería mínima (9%) cuando se utilizan hisopos rectales, incrementándose hasta 78% si se utilizan 25 gr de heces (Funk *et al.*, 2000). Por lo tanto, una escasa cantidad de muestra a analizar podría impedir la detección de *Salmonella*. En los protocolos internacionales se recomienda el uso de 25 gr de muestra por ser una cantidad suficientemente grande y todavía manejable en el laboratorio (Anónimo, 2007).

IV) Muestras individuales o mezclas (*pool*) de muestras: cuando se analizan heces, el uso de *pooles* o mezcla de heces parece mejorar la sensibilidad de la microbiología (Arnold *et al.*,

2015; Martelli *et al.*, 2017), además de facilitar la recogida de muestras. Sin embargo, el uso de *pooles* solo tiene sentido cuando la unidad de análisis es la cuadra, nave o explotación.

Además, existen otros factores asociados con la dinámica de infección en los animales que también pueden afectar a la sensibilidad de los resultados del cultivo microbiológico de *Salmonella*. Por ejemplo, la excreción intermitente de la bacteria en heces (Nielsen *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2013), la cantidad de *Salmonella* excretada (Eriksson *et al.*, 2007), o incluso la capacidad invasiva de nódulos linfáticos de ciertos serotipos de *Salmonella* (Cardona *et al.*, 2005; Methner *et al.*, 2011). Incluso se ha observado que el serotipo puede afectar a la sensibilidad de la bacteriología en función del medio de cultivo utilizado (Rostagno *et al.*, 2005).

Para evitar los problemas asociados con la gran variedad de protocolos de cultivo existentes y permitir la comparación de resultados, la UE decidió estandarizar un método de referencia para todos los Estados Miembros. De esta manera, ya en el año 2001 la Organización Internacional de Normalización publicó la Norma Europea EN ISO 6785:2001 para la detección de *Salmonella* spp. en leche y productos lácteos y un año más tarde la Norma Europea EN ISO 6579:2002 que especificaba el 1^{er} método horizontal para la detección de *Salmonella* aplicable al resto de productos destinados a consumo humano, alimentos para animales y muestras ambientales en el área de la producción y manejo de alimentos. Posteriormente, la norma se actualizó mediante la EN ISO 6579:2002/Amd1:2007 Anexo D para la detección de *Salmonella* spp. en muestras fecales de animales y muestras ambientales derivadas de la producción primaria. La norma se dividió en 3 partes: la detección de la bacteria (Parte 1), la enumeración bacteriana (Parte 2) y la serotipificación del aislado (Parte 3), y se convirtió en el método de referencia en los estudios de salmonelosis porcina (Anónimo, 2007). Finalmente, la coexistencia de las tres Partes de la Norma ISO 6579:2002/Amd1:2007 provocó la decisión de iniciar un proceso de revisión técnica y unificación de la Norma. Como resultado, en el año 2017 se aprobó la nueva Norma Europea EN ISO 6579-1:2017 como nuevo método horizontal de referencia para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella* spp. (Anónimo, 2017). Los principales cambios introducidos fueron, entre otros, ampliación del rango de incubación de los medios no selectivos (34 °C – 38 °C), posibilidad de elección entre caldo o agar semisólido Rappaport Vassiliadis para el enriquecimiento selectivo y la posibilidad de confirmación bioquímica directa de una sola colonia sospechosa bien aislada y diferenciada (Mooijman *et al.*, 2019).

Una vez aislada la bacteria, ésta se tipifica mediante métodos fenotípicos (basados en el análisis de las características bioquímicas y/o fisiológicas expresadas por la bacteria) y

genotípicos (basados en el análisis de ADN cromosómico o extracromosómico de la bacteria), permitiendo así la caracterización y el estudio epidemiológico de las cepas causantes de la enfermedad.

En relación a la caracterización fenotípica, existen varias técnicas como las pruebas bioquímicas, que permiten la confirmación de los aislados sospechosos de *Salmonella*. La serotipificación es la técnica más empleada y permite la clasificación del género *Salmonella* por debajo del nivel de subespecie en determinados serotipos, mediante el uso de antisueros frente a los antígenos somáticos de superficie (O), flagelares (H) y, en algunos casos, capsulares (Vi) de *Salmonella*. Otra técnica es el fagotipado, que mediante el uso de bacteriófagos altamente específicos a determinados serotipos permite tipificar cepas de un mismo serotipo en función del patrón de lisis obtenido cuando se infecta la bacteria mediante una batería de bacteriófagos. La presencia de resistencias a los antimicrobianos permite también la caracterización de las cepas en función de los diferentes patrones de resistencia antimicrobiana. Esto se puede realizar mediante el uso de técnicas cuantitativas que determinan la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) o cualitativas, como el método de difusión en disco (Método de Kirby-Bauer).

Diferentes técnicas de biología molecular, más rápidas que las técnicas tradicionales basadas en medios de cultivos, permiten complementar la caracterización de las cepas gracias al análisis del ADN. Algunos ejemplos son: (I) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite amplificar regiones del genoma de *Salmonella* y la variante cuantitativa o *real-time* (qPCR) que optimiza la técnica mediante la aplicación de fluorescencia, (II) Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) que combina la electroforesis con la macrorrestricción del ADN, (III) Análisis de Variabilidad de secuencias Multi-Locus o MLVA (por su siglas en inglés, *Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis*) para el análisis de secuencias repetidas de nucleótidos o VNTR (por sus siglas en inglés, *Variable Number of Tandem Repeat*) y (IV) Secuenciación Genómica Masiva o WGS (por sus siglas en inglés, *Whole Genome Sequence*) que permite la secuenciación completa del genoma de la bacteria, una de las técnicas más actuales de caracterización completa de la cepa.

A la hora de diagnosticar la infección en grandes poblaciones de animales el análisis bacteriológico puede resultar lento, caro y poco práctico, y por ello se aplican métodos de diagnóstico indirecto, con un menor coste económico y más rápido de llevar a cabo. Las pruebas serológicas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo constituyen una valiosa herramienta para el diagnóstico indirecto de una infección y entre ellas el ELISA (por sus siglas en inglés,

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es una de las más empleadas para el diagnóstico de *Salmonella* en porcino (Nielsen *et al.*, 1998).

Sin embargo, existen varios factores que pueden afectar a la interpretación de los resultados de esta técnica y que deben ser considerados. Por un lado, los resultados no son comparables entre las diferentes matrices, es decir la composición del suero sanguíneo y la cantidad de anticuerpos allí no es la misma que las del jugo muscular, por lo que los resultados en %DO de un suero no se pueden comparar con los obtenidos del jugo muscular con el mismo ELISA (Hiller *et al.*, 2011; Vico *et al.*, 2011a). El curso de la infección en el momento de la toma de muestras también puede afectar a los resultados, ya que los anticuerpos no aparecen hasta los 10-14 días post-infección (Nielsen *et al.*, 1995; van Winsen *et al.*, 2001; Lo Fo Wong *et al.*, 2004) o incluso con un retraso de 4 semanas (Nair *et al.*, 2018). Por lo tanto, un único muestreo puntual puede ofrecer un resultado sesgado de la situación real de la infección en la explotación, haciéndose necesario la realización de varios muestreos seriados. También hay que tener en cuenta que la serología indica una exposición previa del animal a la bacteria, pero la detección de inmunoglobulinas (IgG) no diferencia entre infecciones actuales o pasadas, por lo que su interpretación a nivel individual resulta complicada. Su principal finalidad es, por consiguiente, determinar el grado de exposición a *Salmonella* spp. de un rebaño (Nielsen *et al.*, 1995). Finalmente, existe una falta de correlación entre la excreción de *Salmonella* en heces y la aparición de anticuerpos en suero (Funk *et al.*, 2005; Farzan *et al.*, 2007; Mainar-Jaime *et al.*, 2008; Rostagno *et al.*, 2009) lo que supone otra dificultad a la hora de interpretar los resultados.

En el siguiente apartado se detallan las técnicas empleadas en los trabajos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral.

2.1. Técnicas de diagnóstico de *Salmonella* utilizadas

2.1.1. Cultivo microbiológico

Para realizar los análisis bacteriológicos se utilizó la norma de referencia EN ISO 6579:2002/Amd1:2007 Anexo D (ISO 6579), que consta de 4 etapas explicadas a continuación (Figura 2):

1ª) Pre-enriquecimiento no selectivo: es recomendable cuando la *Salmonella* pueda estar presente en bajas cantidades (como, por ejemplo, muestras fecales o muestras ambientales del interior de las explotaciones) o pueda venir acompañada de otras Enterobacterias que puedan interferir en el diagnóstico (por ejemplo, *E. coli*). El pre-enriquecimiento de la muestra a analizar en un medio no selectivo permite además recuperar las bacterias que han podido quedar dañadas por las condiciones ambientales o por la acción del pH y las condiciones del aparato

digestivo de los animales. Entre la variedad de medios que existen, la ISO 6579 utiliza de forma general el agua de peptona tamponada (BPW, por sus siglas en inglés *Buffered Peptone Water*), que mantiene el pH del medio al no contener azúcares fermentables, por lo que su elevada capacidad tampón es un punto a favor respecto a medios usados con anterioridad, como el caldo de lactosa (LB), que provocaban una acidificación perjudicial para *Salmonella*. No es conveniente prolongar el tiempo de incubación en esta etapa, ya que se favorece la proliferación de otras bacterias competidoras que pueden afectar al diagnóstico, ni tampoco acortarla, ya que puede reducir la sensibilidad de la muestra (Waltman, 2000). La ISO está validada para análisis de 25 gr de muestra (por ejemplo, contenido fecal). En el caso de analizar nódulos linfáticos mesentéricos o muestras ambientales, no siempre es fácil obtener 25 gr de muestra. En estas ocasiones, la ISO 6579 permite realizar el análisis de menos cantidad de muestra siempre que se utilice en una dilución 1:10 con BPW.

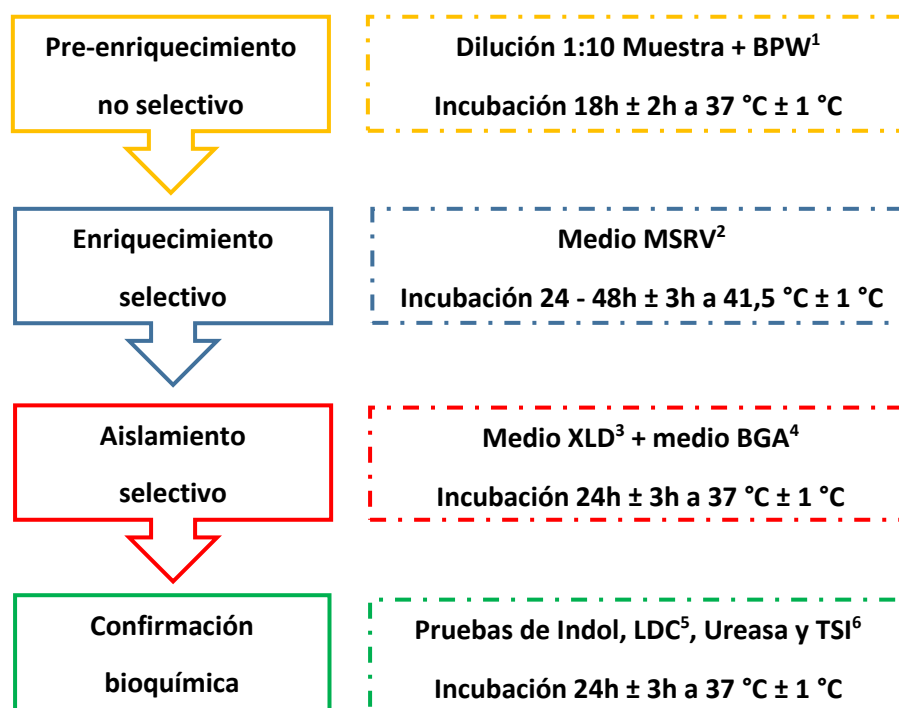
2ª) Enriquecimiento selectivo: esta etapa tiene como objetivo facilitar la multiplicación de *Salmonella* hasta concentraciones que permitan su aislamiento, mientras que se inhiben selectivamente otras bacterias presentes en la muestra. La ISO 6579 utiliza el medio semisólido de Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV, por sus siglas en inglés *modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis*) que evita la toxicidad de medios usados con anterioridad, como el caldo de selenito (Waltman, 2000). Este medio tiene como origen el caldo Rappaport-Vassiliadis, al que le ha sido añadido agar semisólido para favorecer el crecimiento y la migración de las cepas móviles de *Salmonella*, mayoritarias en el ganado porcino. Con el objetivo de inhibir posible flora competitiva, este medio contiene además verde malaquita y novobiocina. La temperatura de incubación superior a 37 °C facilita la inhibición del crecimiento de otras bacterias, pero no impide el de *Salmonella*.

3ª) Aislamiento en medios selectivos: esta etapa tiene como objetivo principal el aislamiento específico de *Salmonella* frente a otras posibles bacterias presentes en la muestra. Como objetivo secundario, permite la inhibición de flora competitiva mediante la incorporación de sustancias inhibitorias al medio de cultivo. Durante esta etapa, la ISO 6579 utiliza como primer medio el agar de xilosa lisina desoxicolato (XLD), que permite inhibir gran número de bacterias Gram positivas gracias al desoxicolato sódico, mientras presenta un azúcar (xilosa) fácilmente fermentable por casi todos los microorganismos entéricos, excepto *Shigella*. Además, en este medio *Salmonella* presenta un crecimiento típico caracterizado por colonias rojas con centro negro, debido a la producción de ácido sulfhídrico, lo que permite una diferenciación rápida de la bacteria.

De acuerdo con la ISO 6579, se debe usar un segundo medio de libre elección para aumentar la sensibilidad del diagnóstico (Waltman, 2000). En nuestro caso se escogió el agar verde brillante (BGA, por sus siglas en inglés, *Brilliant Green Agar*) debido a que, entre otras características, el colorante verde brillante del medio inhibe las bacterias Gram positivas y las colonias de *Salmonella* presentan un color rosáceo con un fondo rojo brillante.

4ª) Confirmación bioquímica: mediante la realización de varias pruebas bioquímicas se realiza la caracterización bioquímica y se completa la identificación de colonias de *Salmonella*. A partir de colonias sospechosas compatibles con *Salmonella*, se siembran los medios necesarios para la confirmación. En nuestro caso, sobre el medio TSI (del inglés, *Triple Sugar Iron*) se llevó a cabo la detección de Fermentación de Azúcares (Glucosa, Sacarosa y Lactosa) y la producción de sulfhídrico. Además, se realizaron las pruebas de la Ureasa, de la lisina descarboxilasa (LDC) y prueba del Indol, cuyas reacciones se presentan en la Tabla 1.

Figura 2. Esquema de las etapas del cultivo microbiológico de *Salmonella* de acuerdo a la Norma EN ISO 6579:2002/Amd1:2007.



¹Agua de peptona tamponada ²Medio semisólido de Rappaport-Vassiliadis modificado ³Medio agar de xilosa lisina desoxicolato ⁴Medio agar verde brillante ⁵Lisina descarboxilasa ⁶Medio triple hierro azúcar.

Tabla 1. Resumen de la interpretación y resultados de las pruebas bioquímicas sobre colonias sospechosas de *Salmonella*.

Prueba	Fundamento	Procedimiento	Identificación	Resultado	%*
Indol	Producción de indol	Suspensión bacteriana + Reactivo de Kovacs	Anillo amarillo en superficie	Negativo	98,9
Lisina	Actividad enzimas	Suspensión bacteriana	Color púrpura, sin modificar	Positivo	94,6
descarboxilasa	descarboxilasa				
Ureasa	Urea fuente de carbono	Siembra en superficie	Amarillo, sin modificar	Negativo	99
TSI**	Fermentación glucosa	Siembra en pico y en superficie	Fondo amarillo por producción ácido	Positivo	100
	Producción de gas desde glucosa		Formación de burbujas	Positivo	91,9
	Fermentación lactosa		Superficie sin cambios de color	Negativo	99,5
	Fermentación sacarosa		Superficie sin cambios de color	Negativo	99,5
	Producción sulfuro de hidrógeno		Fondo de color negro	Positivo	91,6

*Los porcentajes indican que no todos los aislados de las variantes séricas de *Salmonella* muestran las reacciones marcadas como positivas o negativas ** Triple hierro azúcar.

2.1.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Todos los estudios de esta Tesis Doctoral en los que se ha usado esta técnica indirecta se han llevado a cabo mediante la utilización del *kit* ELISA Herdchek® Swine *Salmonella* (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) de acuerdo con las instrucciones del manual del fabricante. Este ELISA es el que mostró una mejor relación sensibilidad/especificidad diagnóstica en nuestras condiciones de laboratorio (Vico *et al.*, 2010). Este *kit* detecta inmunoglobulinas (IgG) frente al lipopolisacárido de los serogrupos B, C1 y D de *Salmonella*, que son los más frecuentes en el cerdo tanto en España como en Europa.

El nivel de anticuerpos presentes en la muestra (suero o jugo muscular) viene determinado por la intensidad de color expresado en porcentaje de densidad óptica (%DO), medido a una longitud de onda de 650 nm, con respecto a sueros controles positivos y negativos. Un animal se considera seropositivo si los resultados de %DO sobrepasan un cierto valor o punto de corte. Actualmente, y dadas las condiciones epidemiológicas en España, el punto de corte más utilizado es %DO \geq 40, pues permite aumentar la especificidad de la técnica (Nollet *et al.*, 2005a; Vico *et al.*, 2010).

2.2. Técnicas de caracterización de *Salmonella* utilizadas

2.2.1. Serotipificación

La serotipificación de todas las muestras analizadas en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo por el Laboratorio Nacional de Referencia para la Salmonelosis Animal (LNRSA) de Algete en Madrid, mediante la caracterización por serotipado de acuerdo con el esquema White-Kauffmann-Le Minor, que se actualiza periódicamente por el *Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella* de la OMS (Instituto Pasteur, Paris).

Esta técnica se basa en la caracterización inmunológica mediante el uso de antisueros mono y polivalentes frente a los antígenos somáticos de superficie (O), flagelares (H) y, en algunos casos, capsulares (Vi) de la bacteria *Salmonella*. Los antígenos somáticos determinan el serogrupo y los flagelares y capsulares, la serovariedad. Así, la fórmula antigénica de un aislado de *Salmonella* spp. vendrá expresada de la siguiente forma: antígenos-O, antígeno-Vi: antígenos-H de la primera fase: antígenos-H de la segunda fase.

2.2.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

La técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) fue desarrollada por primera vez a principios de 1980 (Schwartz *et al.*, 1984) y todavía se considera la técnica de referencia o *gold standard* para la caracterización genotípica de *Salmonella* (CDC, 2013).

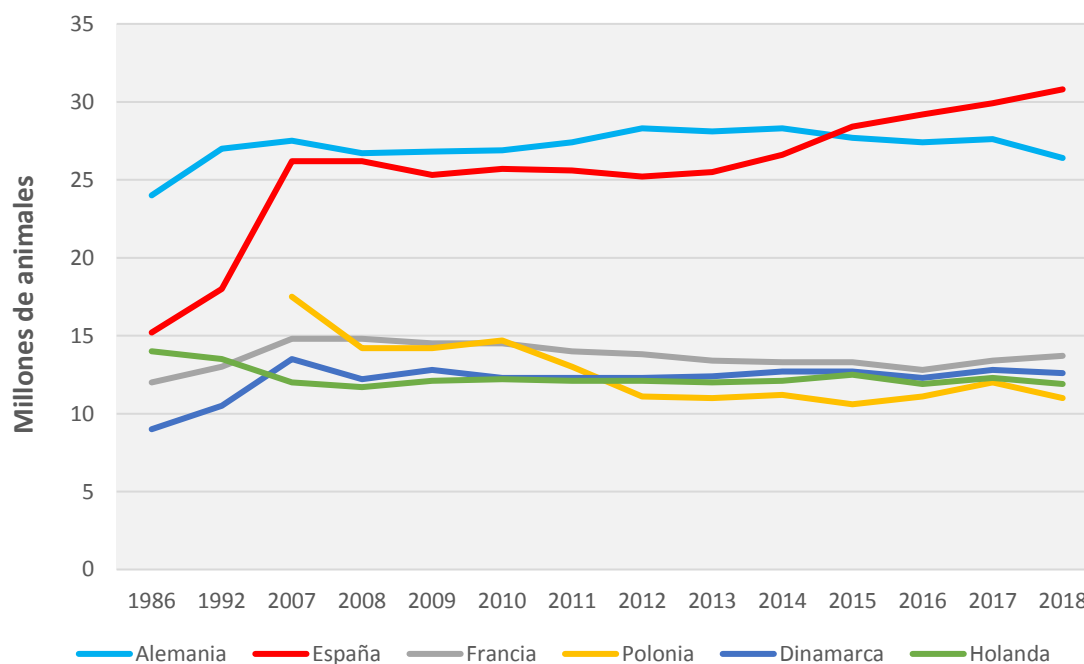
Esta técnica se caracteriza por el uso de enzimas de restricción de baja frecuencia de corte en puntos específicos del genoma bacteriano, produciendo la división del ADN en pocos fragmentos, pero de gran tamaño, superior a los 40 kb. La electroforesis convencional no es capaz de separar moléculas mayores de 40-50 kb, por lo que la ventaja de esta técnica radica en el uso de corriente eléctrica mediante pulsos periódicos, que reorientan el campo eléctrico y permiten la resolución de fragmentos de hasta 1.000 kb. Como mayor inconveniente presenta el tratarse de una técnica laboriosa, de varios días de duración, que puede no ser capaz de discriminar aislados genéticamente muy similares (Lindstedt *et al.*, 2013).

El análisis de las muestras de esta Tesis Doctoral mediante PFGE ha sido realizado en colaboración con el Grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza. El protocolo de la técnica (Ribot *et al.*, 2006) se describe de forma detallada en el ANEXO I.

3. El sector porcino en España

España es actualmente el 4º productor mundial de porcino con un 3,9% del total, solo por detrás de China (48,1%), Estados Unidos (10,5%) y Alemania (5%) (MAPAMA, 2018b). El número de cabezas de ganado porcino superó en 2018 la barrera de los 30 millones en España, dejando a nuestro país como líder en censo porcino dentro de la UE, una tendencia al alza ininterrumpida desde el año 2013 (MAPA, 2019a). De hecho, España ha doblado el censo de porcino en los últimos 30 años, desde los 15 millones en 1986 hasta los 30,8 millones alcanzados a fecha de noviembre de 2018, lo que pondría de manifiesto su crecimiento consolidado (MAPA, 2019a). Esta tendencia contrasta con la del resto de países de la UE, donde la mayoría de ellos han mantenido el censo sin cambios significativos en la última década (Figura 3).

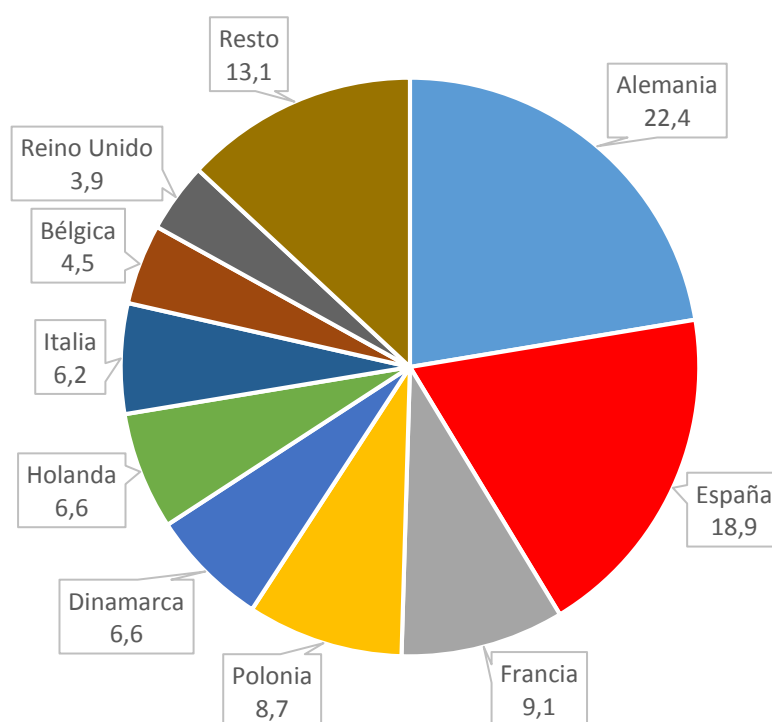
Figura 3. Evolución del censo porcino (millones de animales) en los principales países productores de la Unión Europea (MAPAMA, 2018b; MAPA, 2019a).



Aunque este récord en el censo porcino deriva en parte del aumento del número de cerdas reproductoras en España (2,5 millones de cabezas), todavía sigue por debajo del máximo histórico de casi 2,7 millones de cabezas alcanzado en el año 2006 (MAPAMA, 2018b). Esto sugiere que ha sido en buena medida el aumento de la productividad de las explotaciones porcinas lo que ha permitido alcanzar las cifras récord en censo porcino.

En cuanto al número de sacrificios, en 2018 España se situó en segundo lugar dentro de la UE con 52,4 millones de cerdos sacrificados ($\approx 20\%$ del total de sacrificios de la UE) (MAPA, 2019b), algo menos que Alemania con 56,6 millones (Anónimo, 2019). En relación a la producción de carne de cerdo en la UE (Figura 4), España se situó en 2º lugar con 4,5 millones de toneladas (18,9% del total de la UE), sólo por detrás de Alemania con 5,3 millones de toneladas (22,4% del total de la UE), debido al mayor número de animales importados para sacrificio por este país (EUROSTAT, 2019). En general, la producción de carne en España se incrementó un 5,2% en 2018 con respecto a 2017, año en el que ya se había producido un ligero incremento del 1,7% respecto al año anterior.

Figura 4. Distribución (%) de los principales países productores de carne de cerdo de la Unión Europea durante el año 2018 (EUROSTAT, 2019).



Según los últimos datos publicados en España, en el año 2017 el consumo per cápita de carne fue de 47,6 kg (5% menos que el año 2016) (MAPA, 2018). El cerdo es el principal tipo de carne consumida (fresca y transformada) en España (≈ 22 kg per cápita), seguida por la carne fresca de pollo, con 12,99 kg por persona y año.

España alcanzó en el año 2017 un nivel de autoabastecimiento de carne de porcino del 174% (12% más que el año anterior) debido al estancamiento de consumo interno y al gran aumento de la producción, un nuevo récord desde que en el año 2005 se alcanzara el 100% de autoabastecimiento (MAPAMA, 2018b). El exceso de producción permitió situar a España como el 2º país exportador de carne de cerdo en la UE, alcanzado el 20,2% del total de las exportaciones, solo por detrás de Alemania (22,7%) y superando por segundo año consecutivo a Dinamarca (14,8%) (MAPAMA, 2018b). Del total de carne de cerdo producida en España, el 51% fue exportado a la UE o países terceros (MAPAMA, 2018b).

4. La importancia de la salmonelosis en Salud Pública

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son un problema global que afecta anualmente a 1 de cada 10 personas en el Mundo (WHO, 2018). Entre ellas, las enfermedades gastrointestinales son las más extendidas, afectando a cerca de 550 millones de personas al año. Una de cada cuatro infecciones tiene como origen *Salmonella*, siendo una de las infecciones gastrointestinales transmitidas por los alimentos más comunes en humanos y responsable de unas 155.000 defunciones anuales (Majowicz *et al.*, 2010).

El cuadro clínico característico de la salmonelosis en humanos cursa con dolor abdominal, fiebre elevada, diarrea, náuseas y, en ocasiones, vómitos (Carlson *et al.*, 2012). Los síntomas aparecen entre las 6-72 horas tras la ingesta de alimentos o agua contaminada y la sintomatología suele durar entre 2-7 días. Al ser una enfermedad generalmente autolimitante, suele desaparecer sin tratamiento, pero en ocasiones puede requerir tratamiento antibiótico, bien por afectar a poblaciones de riesgo como niños, ancianos y personas inmunodeprimidas, o bien por provocar sintomatología grave asociada con deshidratación o septicemia severa.

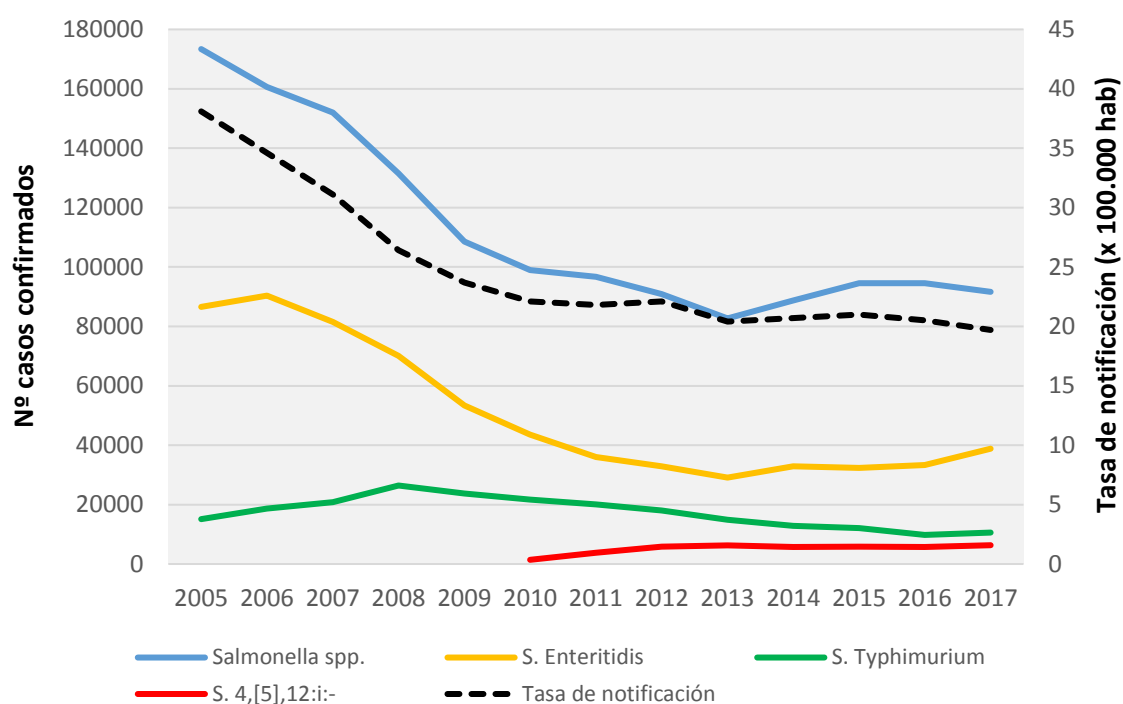
4.1. En la Unión Europea

En la Unión Europea (UE) *Salmonella* continúa siendo un importante problema de Salud Pública. En el año 2017 la salmonelosis se situaba en segundo lugar, por detrás de la campylobacteriosis, como zoonosis transmitidas por alimentos. Sin embargo, alcanzaba el primer puesto en número de brotes de enfermedad de origen alimentario (1.241 brotes), un 24,4% del total en la UE (EFSA, 2018). A lo largo de 2017 se confirmaron 91.662 casos de salmonelosis no tifoidea, un 2% menos que el año 2016 (Figura 5).

Los tres principales serotipos asociados a la salmonelosis humana en la UE en 2017 fueron *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y la variante monofásica de *S. Typhimurium* (en adelante, *S. 4,[5],12:i:-*) (EFSA, 2018). Los casos por *S. Enteritidis* aumentaron un 16,4% en ese año, alcanzado niveles de prevalencia en humanos similares al año 2011, lo que podría estar relacionado en parte con un aumento de la prevalencia de *S. Enteritidis* en gallinas ponedoras (de un 0,7% al 1,21%) desde el año 2014 (EFSA, 2017a). Los casos asociados a *S. Typhimurium* también aumentaron un 8% respecto al año anterior, invirtiendo la tendencia decreciente que se había iniciado en el año 2009. *Salmonella* 4,[5],12:i:- está considerado un serotipo emergente de gran importancia debido al aumento global de la incidencia en humanos y a su asociación con resistencias antimicrobianas en producción animal (Switt *et al.*, 2009). La incidencia asociada con este serotipo también aumentó en 2017 hasta alcanzar los 6.324 casos confirmados (un incremento del 11%), el número máximo de casos por este serotipo desde el año 2010,

confirmando la importancia de este serotipo en la incidencia global de casos por *Salmonella* (EFSA, 2018).

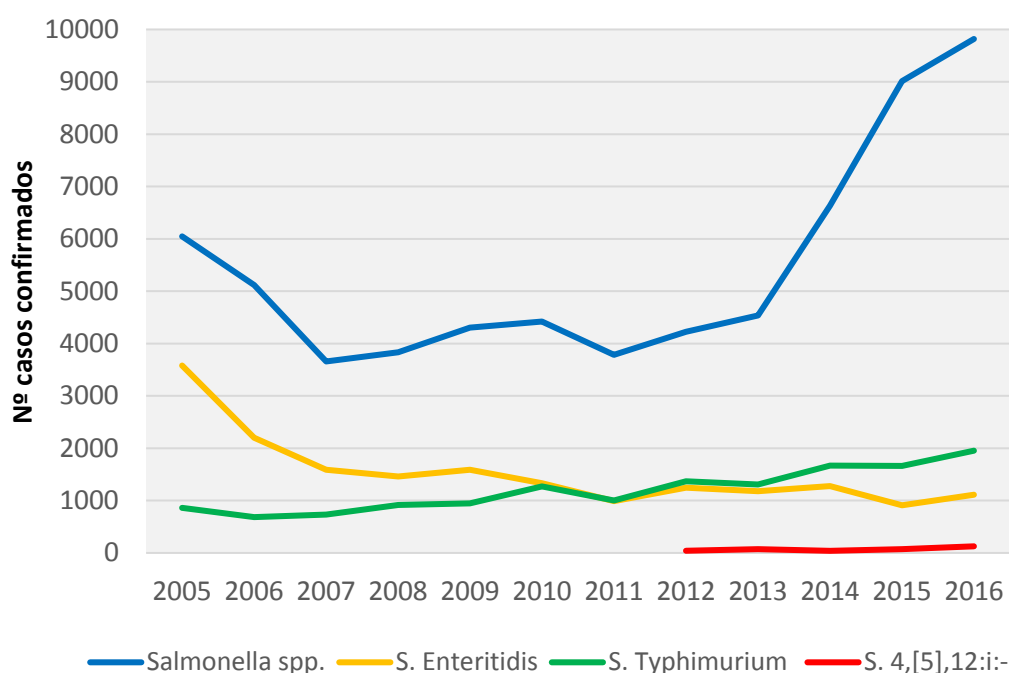
Figura 5. Evolución del número de casos confirmados de salmonelosis no tifoidea y de la tasa de notificación en humanos dentro de la Unión Europea entre 2005-2017 (EFSA, 2018).



4.2. En España

En España, al igual que en la UE, *Salmonella* es el principal agente causal en los brotes de enfermedad de origen alimentario (EFSA, 2018). De acuerdo con esta agencia, en el año 2017 se confirmaron un total de 9.426 casos de salmonelosis, alcanzando el 10,3% del total de casos en la UE, solo superado por Reino Unido (11,1%), República Checa (12,5%) y Alemania (15,3%). En ese año se produjo, por primera vez desde el 2012, un descenso en el número total de casos (392 casos menos, -4% respecto al año anterior). No obstante, la incidencia se mantiene alarmantemente elevada en España, debido a un aumento significativo del 158% en el número de casos confirmados desde el año 2007 (Figura 6).

Figura 6. Evolución del número total de casos confirmados de salmonelosis no tifoidea en humanos (EFSA, 2018) y de los principales serotipos de *Salmonella* (RENAVE, 2018) durante el periodo 2005-2016 en España.



Para conocer en detalle la incidencia de los serotipos más importantes en España debemos basarnos en los datos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) y del Sistema de Información Microbiológica (SIM) recogidos por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III. La cobertura poblacional del último Informe SIM se estima en un 30% del país y no abarca a todas las CC.AA. (SIM, 2017). De acuerdo con los últimos datos publicados de 2016, en España se identificó el serotipo responsable en alrededor del 50% de los brotes causados por *Salmonella* (3.325 casos totales, $\approx 32\%$ del total) (SIM, 2017). Al igual que en la UE, los tres serotipos más prevalentes en España fueron, *S. Typhimurium* (58,7%), *S. Enteritidis* (33,4%) y *S. 4,[5],12:i:-* (3,8%), correspondiente con los datos de 13 CC.AA., Ceuta y Melilla (RENAVE, 2018).

A pesar del descenso en el año 2017 en el número de casos por *Salmonella* en España, la tendencia al alza de salmonelosis humana desde el año 2012 estaría asociada con el aumento continuado de la incidencia de *S. Typhimurium* desde 2012, incluso superando a los casos provocados por *S. Enteritidis* (Figura 6). Este hecho contrasta con la UE, en la que el incremento de casos por *Salmonella* se ha asociado a un aumento de la incidencia de *S. Enteritidis*. En este sentido, hay que destacar también que, a pesar de la implantación de los programas de control

de *Salmonella* en avicultura en España, la incidencia de *S. Enteritidis* también aumentó en el año 2016 en nuestro país, de la misma forma que en la UE (Figura 5). Con respecto a los casos por *S. 4,[5],12:i:-*, desde el año 2012 solo una CCAA (Asturias) ha informado sobre casos asociados con la variante monofásica de Typhimurium, a pesar de existir varias publicaciones sobre brotes en España por este serotipo que confirman su establecimiento en nuestro país (Arnedo-Pena *et al.*, 2016; Hernández-Arricibita *et al.*, 2016; De Frutos *et al.*, 2018). Por ello, estos datos no permiten sacar ninguna conclusión sobre la tendencia real que este serotipo tiene en la incidencia de salmonelosis humana en nuestro país.

5. Papel del cerdo en la salmonelosis humana

La carne de cerdo es el tipo de carne más consumido en la UE ($\approx 45\%$ del total), por lo que no es de extrañar que, de las más de 330.000 muestras procedentes de alimentos analizadas en la UE en el año 2017, más de un 50% (174.852) fueran productos cárnicos de origen porcino (EFSA, 2018). Conviene destacar que del total de muestras cárnicas analizadas (284.090) de las especies animales incluidas en el último informe de la EFSA (EFSA, 2018), los principales productos contaminados por *Salmonella* fueron la carne fresca de aves (pollo y pavo) con 3,9% de muestras positivas, seguido de la carne fresca de cerdo (1,6%).

La situación en España fue algo más seria en relación a la carne fresca de cerdo en 2016 (último año con datos oficiales publicados), siendo el alimento más afectado por la contaminación por *Salmonella*, con el 12,84% de muestras positivas (MAPAMA, 2018a) (Tabla 2). Sin embargo, solo el 0,55% de las muestras de carne fresca de ave resultaron contaminadas.

Tabla 2. Principales muestras de alimentos de origen animal contaminadas por *Salmonella* en España (MAPAMA, 2018a) y en la Unión Europea (EFSA, 2017a) en el año 2016.

	España		Unión Europea	
	Muestras analizadas	Muestras positivas a <i>Salmonella</i> spp. (%)	Muestras analizadas	Muestras positivas a <i>Salmonella</i> spp. (%)
Carne fresca de cerdo	1.371	176 (12,84)	25.049	596 (2,38)
Huevos	341	14 (4,11)	5.782	17 (0,29)
Preparados de carne	682	12 (1,76)	11.440	173 (1,51)
Carne fresca de vacuno	383	4 (1,04)	23.708	50 (0,21)
Carne fresca de ave	2.380	13 (0,55)	29.526	1.944 (6,58)
Moluscos bivalvos	51	0 (0)	199	4 (2)
TOTAL	5.663	219 (3,87)	95.704	2.784 (2,91)

Durante el 2017, en la UE se tipificaron alrededor del 46% de los aislados de *Salmonella* de los productos contaminados de origen animal (2.497 aislados) (EFSA, 2018). Los 5 serotipos aislados con mayor frecuencia fueron *S. Infantis* (36,2%), *S. Typhimurium* (11,3%), *S. Enteritidis* (10,6%), *S. 4,[5],12:i:-* (5,8%) y *S. Newport* (2,2%). Los serotipos *S. Infantis*, *S. Enteritidis* y *S. Newport* se asociaron principalmente (97% de los aislados) con productos de origen aviar (huevos, pollo y pavo), mientras que los serotipos *S. Typhimurium* y *S. 4,[5],12:i:-* estuvieron relacionados con los productos derivados del cerdo (66,8% de los aislados).

Los datos oficiales disponibles en España para el año 2016 son bastante menos detallados. Solo se describen los tres serotipos más frecuentemente aislados en muestras de alimentos, sin especificar su origen. Así, el principal serotipo aislado fue *S. Typhimurium* (23%), seguido por *S. 4,[5],12:i:-* (19,5%) y *S. Enteritidis* (2,3%) (MAPAMA, 2018a). Considerando la evidente relación observada en los datos de la UE entre los dos primeros serotipos y la carne de cerdo, y entre *S. Enteritidis* y los productos de origen aviar, es lógico pensar en un origen similar para los aislados identificados en nuestro país. Estos datos sugieren que el consumo de carne de cerdo podría estar detrás de numerosos casos de salmonelosis humana, puesto que *S. Typhimurium* y *S. 4,[5],12:i:-* son el 1^{er} y 3^{er} serotipos más frecuentemente encontrados en los casos de salmonelosis humana en España, y el 2^o y 3^{er} serotipos más frecuentes a nivel de la UE.

Varios estudios epidemiológicos sugieren una relación entre el consumo de ciertos tipos de carne de cerdo y brotes de salmonelosis en humanos (Campos *et al.*, 2019). En España, por ejemplo, se han asociado brotes de salmonelosis al consumo de longaniza seca de origen porcino (Arnedo-Pena *et al.*, 2016), de chorizo (Hernández-Arricibita *et al.*, 2016) o de bocadillos de carne asada de cerdo (De Frutos *et al.*, 2018), aislándose *S. 4,[5],12:i:-* como principal serotipo en todos los brotes. Incluso se ha encontrado esta relación en ciertos casos esporádicos de salmonelosis humana, a pesar de la escasa información disponible debido a los pocos estudios epidemiológicos llevados a cabo en España para conocer la fuente de infección (Arnedo-Pena *et al.*, 2018; Arnedo-Pena *et al.*, 2019).

En otros países europeos, con diferentes hábitos de consumo, también se han asociado casos de salmonelosis humana con el consumo de productos de origen porcino (Bonardi, 2017). Así, se ha observado esta relación en el Reino Unido (Cowden *et al.*, 1989; Paranthaman *et al.*, 2013;), Alemania (Jansen *et al.*, 2007; Alt *et al.*, 2015), Italia (Luzzi *et al.*, 2007), Noruega (Nygård *et al.*, 2007), Francia (Bone *et al.*, 2010; Gossner *et al.*, 2011) y Dinamarca (Wójcik *et al.*, 2012; Kuhn *et al.*, 2013). Igualmente, en muchos de estos estudios, era el serotipo *S. 4,[5],12:i:-* el que aparecía como principal responsable del brote, evidenciando la más que probable relación entre el porcino y la salmonelosis humana.

En cualquier caso, relacionar en España los casos de salmonelosis humana con el estatus de *Salmonella* en las granjas de cerdos es una tarea complicada, debido principalmente a la ausencia de un programa oficial de monitorización de *Salmonella* en las explotaciones porcinas. Sin embargo, se dispone de una gran cantidad de datos procedentes de los sistemas de vigilancia de *Salmonella* tanto en humanos como en mataderos, por lo que una mejor comunicación e intercambio de información entre las Instituciones de vigilancia sanitarias permitiría un mejor

estudio del impacto de la infección del ganado porcino en esta zoonosis (Martínez-Avilés *et al.*, 2019).

6. La infección por *Salmonella* en el cerdo

No parece que haya dudas en poder atribuir la mayoría de los brotes de salmonelosis en la población al consumo de productos alimentarios contaminados de origen animal. En este sentido, y de acuerdo con algunos estudios sobre atribución de riesgo (EFSA, 2010; Vigre *et al.*, 2016; Snary *et al.*, 2016), el cerdo podría considerarse como la segunda fuente de infección humana tras las aves, pudiendo incluso llegar a ser la primera en los países del sur de Europa (EFSA, 2018).

Parece obvio entonces que, al igual que se está haciendo con las aves, si se quiere reducir la incidencia general de salmonelosis en humanos, se deba reducir también su incidencia en la cabaña porcina. De acuerdo al estudio de referencia de la EFSA sobre salmonelosis porcina en la UE durante 2006 y 2007, alrededor del 10% de los cerdos estarían infectados por esta bacteria (EFSA, 2008). Esta prevalencia sería máxima en España con un tercio de los animales que llegan a matadero infectados. Desde aquel estudio inicial, parece que la situación no ha cambiado mucho (EFSA, 2009; Vico *et al.*, 2011b; Vico *et al.*, 2012).

Se hace necesario por lo tanto conocer en profundidad la epidemiología de la infección a lo largo de la cadena de producción porcina, desde la explotación ganadera hasta el matadero. Solo de esta manera se podrán aplicar estrategias de control de la infección sobre los cerdos que sean efectivas y redunden finalmente en una disminución de la incidencia humana.

6.1. Dinámica de infección en el animal

Salmonella es una bacteria ubicua y de gran resistencia en el medio ambiente. El hábitat natural de esta bacteria es el tracto digestivo de los animales vertebrados, tanto de sangre fría como caliente, pero se aísla también con frecuencia de insectos, agua o alimentos contaminados, gracias a su capacidad de adaptación (Wales, 2013). La principal vía de transmisión en el cerdo es la vía feco-oral, debido a que la excreción de la bacteria se realiza mayoritariamente por las heces de los animales (Boyen *et al.*, 2008). Como vía secundaria de transmisión se encuentra la vía aerógena, mediante aerosoles y polvo, menos frecuente, pero más rápida a distancias cortas, aunque se desconoce realmente la relevancia de esta vía de transmisión en las infecciones porcinas, que además podría estar asociada con ciertos serotipos (Oliveira *et al.*, 2006).

La salmonelosis porcina se puede presentar de dos formas: clínica y asintomática (o subclínica). La salmonelosis clínica puede cursar, a su vez, con dos formas diferentes: con un cuadro septicémico generalmente causado principalmente por *S. Choleraesuis* (con una elevada mortalidad y más prevalente en los Estados Unidos), o bien con un cuadro enterocolítico

causado en la mayoría de ocasiones por *S. Typhimurium* (con menor mortalidad y elevada morbilidad, más prevalente en Europa). Ambas presentaciones tienen una relevancia económica importante en la explotación debido a los costes sanitarios que provocan (Fedorka-Cray *et al.*, 2000). La forma asintomática es, por el contrario, la más frecuente en producción porcina y la más importante en Salud Pública, debido a la dificultad de detectar animales portadores que pueden diseminar la infección excretando la bacteria a través de las heces y favorecer la transmisión de *Salmonella* a lo largo de la cadena alimentaria (Haesebrouck *et al.*, 2004; EFSA, 2008).

Se ha demostrado que dosis infectivas de 10^3 UFC/gr pueden ser suficientes para provocar la infección experimental en el cerdo por vía oral (Loynachan *et al.*, 2005; Boughton *et al.*, 2007), aunque la dosis puede variar en función de la ruta de infección. Cuando se administra la bacteria por vía oral, la primera barrera que *Salmonella* debe superar es la actividad antimicrobiana de la saliva (Shi *et al.*, 1999) y posteriormente las defensas asociadas con el tejido linfoide de las tonsilas orofaríngeas (Horter *et al.*, 2003). A continuación, deberá sobrevivir al ambiente ácido del estómago (Boyen *et al.*, 2008). Para que se produzca la colonización intestinal, deberá resistir la acción de las sales biliares, las defensas inmunitarias locales del animal, el peristaltismo del intestino y el ambiente anaerobio (Álvarez-Ordoñez *et al.*, 2011). Una vez entra en contacto con los enterocitos a través de las fimbrias, se adhiere a estos y los invade, aunque también puede colonizar las células M de las placas de Peyer (Hallstrom *et al.*, 2011). A partir de ahí, puede atravesar la pared intestinal e invadir los nódulos linfáticos mesentéricos, donde suele acantonarse (Boyen *et al.*, 2008). A pesar de que puede parecer un proceso largo, algunos serotipos son capaces de alcanzar las tonsilas en 30 minutos y llegar a colon, ciego y nódulos linfáticos ileocecales en 2-3 horas (Hurd *et al.*, 2001). Esta dinámica de infección permite clasificar a los cerdos en 3 tipos de portadores subclínicos, siendo de gran relevancia conocer sus diferencias para los programas de control y la aplicación con éxito de las medidas preventivas:

- Cerdos portadores activos: aquellos cerdos infectados por *Salmonella* recientemente que eliminan la bacteria a través de las heces.
- Cerdos portadores silentes: los cerdos con *Salmonella* acantonada en los tejidos del animal, especialmente a nivel de nódulos linfáticos mesentéricos, que pueden excretar la bacteria como resultado de situaciones de estrés.
- Cerdos portadores pasivos: cerdos con la bacteria presente en las heces, sin estar acantonada en los nódulos linfáticos mesentéricos.

Si la infección se reduce al intestino del animal y sus nódulos linfáticos asociados, queda caracterizada como una infección localizada. Pero en el caso de dosis infectivas elevadas ($10^6 - 10^8$ UFC/gr), o de infecciones en animales jóvenes (con menor capacidad acidificante del estómago y menor producción de sales biliares) o animales inmunodeprimidos, la bacteria puede superar con más facilidad la acidez de la parte proximal del tubo digestivo, evadir las barreras intracelulares de las células intestinales y pasar a sangre, donde puede introducirse en los macrófagos. Es entonces cuando se diseminará por todo el organismo, provocando una infección generalizada, iniciando la fase sistémica de la infección. El tipo de infección final también suele tener que ver con el serotipo de *Salmonella* implicado en la infección, pues pueden diferir en su capacidad invasiva (Cardona *et al.*, 2005; Methner *et al.*, 2011; Ivanek *et al.*, 2012).

Como hemos comentado, la eliminación de la bacteria por el animal infectado se produce generalmente a través de las heces. Inicialmente, en el curso de la enfermedad se excreta una gran cantidad de bacterias (10^6-10^8 UFC/gr) durante un promedio de dos semanas post-infección (Pires *et al.*, 2013). Posteriormente, la excreción disminuye y se vuelve intermitente, dependiendo en gran medida de posibles situaciones de estrés que pueden reactivar la excreción (Nielsen *et al.*, 1995; Pires *et al.*, 2013).

6.2. Epidemiología de *Salmonella* en las explotaciones porcinas

Debido a la elevada prevalencia de la forma asintomática de la infección en el cerdo, el conocimiento de su epidemiología en las explotaciones es difícil, ya que la detección de animales infectados no es sencilla y no se realiza de manera rutinaria en las explotaciones.

6.2.1. Cebo

La mayoría de los trabajos acerca de la epidemiología de la *Salmonella* se han centrado en su estudio durante la fase de engorde y sacrificio, último punto de la cadena de producción porcina previo a la comercialización de la carne (Davies *et al.*, 1997; van der Wolf *et al.*, 1999; van der Wolf *et al.*, 2001; Kranker *et al.*, 2003; Rajic *et al.*, 2005; Farzan *et al.*, 2008; Merialdi *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2013; Nair *et al.*, 2018). De forma general, se puede decir que el inicio de la fase de cebo se caracteriza por bajos niveles de infección y excreción de *Salmonella*, posiblemente asociado al uso masivo de antimicrobianos durante la fase anterior de transición (Fraile, 2016; Li, 2017). Posteriormente, a lo largo de los 3-4 meses del periodo de cebo, la infección tiende a aumentar, debido a la excreción de la bacteria por parte de los cerdos portadores que provocan la diseminación progresiva de la infección mediante la vía feco-oral. Esta diseminación se verá favorecida por momentos de estrés (por ejemplo, cambios

ambientales o la reagrupación de animales), que provocan una reactivación de la excreción a partir de la *Salmonella* acantonada en los nódulos linfáticos de los cerdos infectados (Nielsen *et al.*, 1995; Rostagno *et al.*, 2009; Pires *et al.*, 2013). De esta manera, se alcanza la mayor proporción de cerdos infectados por *Salmonella* en los momentos finales de la fase de cebo, previamente a su transporte a matadero para su sacrificio (Schut *et al.*, 2019). El transporte al matadero y la estabulación transitoria en los corrales de espera del mismo produce estrés en los animales y la consiguiente reactivación de la excreción de la bacteria en los animales infectados, favoreciendo además la infección de aquellos animales que llegaron sanos (Beloeil *et al.*, 2004; Argüello *et al.*, 2013a), actúa como un importante factor de riesgo para la contaminación del matadero y, finalmente, de las canales.

6.2.2. Transición

Como hemos comentado anteriormente, el empleo de antibióticos en el pienso durante la fase de transición ha sido probablemente una de las principales causas de la baja prevalencia de *Salmonella* al inicio del periodo de engorde de los cerdos. El uso de antibióticos durante esta fase permitiría eliminar las bacterias patógenas (*E. coli*, *Salmonella*, etc.) a nivel intestinal y reducir así su excreción, pero, en el caso de *Salmonella*, no llegaría a eliminar por completo a las bacterias acantonadas en los nódulos linfáticos mesentéricos (Griffin *et al.*, 2010; Diard *et al.*, 2014). Por lo tanto, en el caso de animales previamente infectados durante la fase de lactación, el uso de antimicrobianos en transición solo sería una contención temporal de la infección, al poder reactivarse durante la siguiente fase de producción tras eliminar el uso de los antibióticos durante el cebo.

La aparición de resistencias antimicrobianas en producción animal ha provocado la reducción del uso de antibióticos en las diferentes fases de producción y, especialmente, donde más se usan, es decir, en esta fase de transición. Todavía está por ver cuáles serán las consecuencias de la limitación en el uso de antibióticos si no se implementan otras estrategias de una eficacia similar. Se hace por ello imperativo conocer en profundidad la epidemiología de la infección en estas fases tempranas (lactación y transición), con el fin de poder valorar las posibles consecuencias de un nuevo modelo de producción porcina intensiva sin antibióticos en la difusión de la salmonelosis porcina.

6.2.3. Cerdas reproductoras

El control de la infección en las cerdas reproductoras ha sido, hasta el momento, un tema de poco interés en el sector porcino, lo que posiblemente ha favorecido la elevada prevalencia de la infección subclínica que se observa en estos animales (Nollet *et al.*, 2005b;

EFSA, 2009). El mantenimiento de la infección en las explotaciones hace que la probabilidad de exposición a la bacteria se incremente con la edad de los animales (EFSA, 2009). Por lo tanto, la introducción de cerdas de reposición portadoras de *Salmonella* sería un factor de riesgo a tener en cuenta, fundamentalmente en explotaciones libres de *Salmonella* (Dahl, 2011), pero también en explotaciones previamente contaminadas, en las que las cerdas de reposición podrían introducir nuevos serotipos (Davies *et al.*, 2000; Penmetchsa *et al.*, 2009; Schut *et al.*, 2019),

No cabe duda, sin embargo, que las cerdas reproductoras son una fuente de infección para los lechones, y el estrés asociado al momento del parto, podría actuar como factor que reactivara la excreción de la bacteria en las salas de maternidad, diseminando la infección a los lechones al entrar en contacto con las heces de las cerdas en las jaulas de maternidad. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no se ponen de acuerdo en cuál es el momento de más riesgo de excreción de *Salmonella* de la cerda reproductora. Algunos estudios sugieren que sería en el momento del destete (Nollet *et al.*, 2005b), en los días posteriores a él (Parada *et al.*, 2013) o entre 30-60 días post destete (Magistrali *et al.*, 2011). Otros estudios señalan el primer tercio de la gestación como un momento de alto riesgo de excreción (Larivière-Gauthier *et al.*, 2017), mientras que otros indican el final de la gestación (Funk *et al.*, 2001). Incluso el momento de la inseminación artificial, al estar asociado a los cambios hormonales durante la ovulación en la cerda (Lynch *et al.*, 2018). Además, la edad de la cerda también podría afectar significativamente a la excreción, ya que las cerdas primíparas tendrían más riesgo de excreción que las cerdas multíparas (Penmetchsa *et al.*, 2009; Magistrali *et al.*, 2011; Lynch *et al.*, 2018), aunque otros estudios han encontrado la relación contraria, donde la excreción de *Salmonella* aumentaba con la edad de la cerda (Nielsen *et al.*, 2001).

Como podemos observar, hay bastante heterogeneidad en cuanto al momento de más riesgo de excreción de *Salmonella* en las cerdas reproductoras. En cualquier caso, debido al patrón de excreción intermitente en los animales subclínicos, las cerdas infectadas son, sin duda alguna, un factor de riesgo de infección para los lechones a lo largo del periodo de lactación.

6.2.4. Lactación

Al nacer, los lechones deben ingerir el calostro producido por la madre para adquirir energía y cierta inmunidad (IgG principalmente), para hacer así frente a posibles exposiciones a patógenos presentes en el ambiente durante la fase de lactación (Rooke *et al.*, 2002). Algunos estudios sugieren que la inmunidad adquirida protege de la infección por *Salmonella* en los lechones (Parada *et al.*, 2013; Schut *et al.*, 2019). Sin embargo, todavía existen lagunas sobre aspectos como la duración y efectividad de la inmunidad materna, a pesar de que parece

evidente que debe jugar un papel importante en la diseminación de la infección. Los estudios sobre la prevalencia de infección por *Salmonella* en lechones lactantes son escasos (Wales *et al.*, 2011) debido, entre otros motivos, a la dificultad inherente de este tipo de investigaciones que precisan del sacrificio de los animales para el estudio de la infección. Excepto un trabajo publicado recientemente donde se analiza la seroprevalencia frente a *Salmonella* a través de muestras de suero en lechones destetados (Schut *et al.*, 2019), los trabajos anteriores se ciñen al estudio de la excreción de *Salmonella* en los lechones, generalmente a través de muestras fecales obtenidas mediante hisopos rectales (Funk *et al.*, 2001; Barber *et al.*, 2002; Beloeil *et al.*, 2003; Roesler *et al.*, 2005; Lynch *et al.*, 2018), lo que seguramente infraestima la verdadera prevalencia de excreción e impide evaluar adecuadamente el papel que los lechones pueden tener en el mantenimiento y dispersión de la infección en las explotaciones.

7. Estrategias de control de la infección

La finalidad del control de la mayoría de las infecciones de carácter zoonótico en el ganado doméstico es reducir la incidencia de la infección en las personas. Controlando la infección en los animales se incrementa la seguridad de los productos alimenticios derivados de ellos. Considerando que el ganado porcino es la segunda fuente de infección más importante asociada a casos de salmonelosis humana, el control de la infección a lo largo de la cadena de producción porcina resulta fundamental. Sin embargo, la ausencia de síntomas clínicos en la mayoría de los cerdos infectados por *Salmonella* provoca que la infección pase desapercibida y no se tomen las medidas necesarias para su control, pues no se considera una patología prioritaria en la explotación. Como consecuencia, la infección y contaminación por *Salmonella* pueden ocurrir en diferentes etapas de la cadena de producción sin que ni los ganaderos ni los veterinarios la detecten. En la actualidad, podemos encontrar *Salmonella* en todas las fases de la producción porcina, por lo que las medidas de control a aplicar variarán según la etapa de producción considerada, pero con el objetivo de conseguir un efecto global que permita reducir la contaminación final por *Salmonella* de las canales porcinas y evitar así las infecciones humanas.

A continuación, presentamos de forma breve las principales estrategias que se pueden utilizar para el control de la infección en la explotación.

7.1. Higiene y Bioseguridad

En el año 1983 fue publicada por primera vez una guía para la prevención y el control de la *Salmonella* en la cadena productiva (WHO, 1983). Más adelante, la EFSA realizó un estudio sobre medidas preventivas para el control *Salmonella* que dio como fruto la publicación del Reglamento (CE) 2160/2003 de 17 de noviembre de 2003 sobre “el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos”, en el que se señalaba a la bioseguridad como una estrategia fundamental para el control de las zoonosis en las explotaciones porcinas (Anónimo, 2003b). Se entiende por bioseguridad al conjunto de medidas higiénico-sanitarias preventivas que evitan la introducción de una infección en la explotación o su transmisión una vez en la misma (Casal *et al.*, 2007).

Con el objeto de aumentar la eficacia de las medidas de higiene y bioseguridad a realizar, su implementación en una explotación debe venir precedida por el estudio de los factores de riesgo asociados a la infección por *Salmonella* (Pires *et al.*, 2014). Durante las últimas décadas, se han publicado gran número de artículos sobre el estudio de factores de riesgo asociados con la salmonelosis porcina en las distintas etapas de producción (Berends *et al.*, 1996; Bahnson *et*

al., 2006; Beloeil *et al.*, 2007; Vico *et al.*, 2011b; Rostagno *et al.*, 2012; Gotter *et al.*, 2012; Correia-Gomes *et al.*, 2013; Parada *et al.*, 2017; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). Éstos se pueden clasificar en factores que favorecen la introducción y transmisión de la infección en la explotación, por ejemplo a través de fómites contaminados (vehículos, botas y ropa) (Beloeil *et al.*, 2007; Andres *et al.*, 2015) y la presencia de animales ajenos a la explotación (aves silvestres y roedores) que pueden actuar como vectores de la bacteria (Daniels *et al.*, 2003; Andrés *et al.*, 2013; Andrés-Barranco *et al.*, 2014), y factores que favorecen el mantenimiento de la infección una vez introducida, como una limpieza y desinfección deficientes (Martelli *et al.*, 2017).

Por lo tanto, la infección de los animales por *Salmonella* suele tener un origen múltiple (Swanenburg *et al.*, 2001; Barber *et al.*, 2002; Vieira-Pinto *et al.*, 2006; Rostagno *et al.*, 2012; Argüello *et al.*, 2013a; Campos *et al.*, 2019), por lo que la bioseguridad frente a *Salmonella* es compleja y debe basarse en la aplicación constante de distintas medidas preventivas en diferentes momentos del ciclo productivo, lo que implica un trabajo activo y continuado que supone un gran coste económico (Alban *et al.*, 2005; Andres *et al.*, 2015). La realización de encuestas de bioseguridad de forma periódica es una herramienta que permite valorar individualmente el estado de bioseguridad de las explotaciones y detectar los fallos de las mismas de forma económica.

Existe una relación inversa entre la disposición de los ganaderos a aplicar las medidas preventivas frente a la infección y su elevado coste, por lo que la falta de implantación de algunas medidas de bioseguridad en las explotaciones sería un problema recurrente (Fraser *et al.*, 2010). Como consecuencia, la bioseguridad frente a *Salmonella* en las explotaciones no es completa, ni constante, y en muchas ocasiones conlleva resultados negativos evidentes en el control de la infección, lo que desmotiva a los ganaderos en la aplicación de las medidas, incluso cuando estas medidas están asociadas a una mejora general de la productividad en la granja (Andres *et al.*, 2015). Con el fin de incentivar una aplicación efectiva de las medidas de bioseguridad, algunos países como Dinamarca e Irlanda implementaron sanciones económicas a los ganaderos (Alban *et al.*, 2012; Ball *et al.*, 2011). Sin embargo, en otros países como Reino Unido (Ball *et al.*, 2011), estas sanciones económicas no llegaron a implantarse.

Además, fallos de bioseguridad ajenos al ganadero y en etapas posteriores, como el transporte y alojamiento de los cerdos en las cuadras del matadero, puede provocar la infección por *Salmonella* de los animales, pues está demostrado que en cortos periodos de tiempo (6-8 horas) cerdos sanos pueden infectarse y llegar a excretar la bacteria (Hurd, *et al.*, 2001; Boughton *et al.*, 2007). Este es otro de los motivos que disuade a los ganaderos de la aplicación

activa y continuada de las medidas de bioseguridad, debido a que la canal puede acabar contaminada por *Salmonella* a pesar de tener un control estricto de la infección en la explotación. Por otro lado, la falta de apoyo oficial para el control de *Salmonella* en el porcino en nuestro país (a diferencia de lo que ocurre en avicultura), no motiva a los productores a desarrollar de forma voluntaria planes de prevención de la infección.

7.2. Vacunación

La estimulación del sistema inmune es uno de los mecanismos que se pueden usar para prevenir la infección de los animales ante la posible entrada de la misma en la explotación. Con este objetivo, la vacunación frente a patógenos ha sido una herramienta ampliamente utilizada en producción porcina (Haesebrouck *et al.*, 2004; Meeusen *et al.*, 2007; Roth, 2011).

La vacuna ideal debería ser capaz de i) prevenir la colonización del animal por *Salmonella*, ii) impedir la excreción de la bacteria al ambiente, iii) evitar el desarrollo de animales portadores de la infección y, en última instancia, iv) evitar los síntomas clínicos (Rostagno, 2011). Además, la reacción del sistema inmune del animal frente a la vacunación no debería interferir en la interpretación de los resultados serológicos cuando se plantea la monitorización serológica de la infección. De esta manera el uso de vacunas tipo DIVA (*Differentiation of Infected and Vaccinated Animals*), que diferencian los anticuerpos producidos por la infección de los producidos por la vacunación, resultaría aconsejable (Selke *et al.*, 2007).

La vacunación frente a *Salmonella* ha sido una estrategia utilizada con elevada eficacia en la reducción de la infección en gallinas ponedoras y reproductoras, alcanzado muy buenos resultados en las explotaciones avícolas. Sin embargo, a pesar de que en los últimos años se han llevado a cabo varios estudios en producción porcina, no se han conseguido resultados tan prometedores como en avicultura. La realidad es que aunque los factores de riesgo de la salmonelosis son similares para aves y cerdos (deficiente limpieza y desinfección entre lotes, contaminación del pienso y del agua, el estado sanitario de los animales, contaminación cruzada por botas y utensilios contaminados, densidad animal, presencia de vectores como roedores, escarabajos, aves silvestres y moscas, contaminación durante el transporte al matadero, etc.), tanto la dinámica de infección en las aves como los sistemas productivos difieren sustancialmente con respecto al ganado porcino. La transmisión vertical de *Salmonella* a través del huevo, uno de los principales factores de riesgo a considerar en los programas de erradicación en las aves, ha sido ampliamente anulada por la eficacia de una correcta vacunación de gallinas reproductoras y la producción así de pollitos libres de *Salmonella*. El control estricto (bioseguridad) de las naves donde se engordan estos pollitos ha hecho el resto. En resumen, la

vacunación ha resultado fundamental, junto con la bioseguridad y el manejo, en estos programas nacionales de control de *Salmonella* en aves.

La situación en porcino es diferente. El ciclo productivo porcino es mucho más largo, con más fases productivas y mucho más difícil de “cerrar” mediante medidas de bioseguridad debido al mayor movimiento de animales entre naves/granjas. Y aunque no existe transmisión vertical, los lechones lactantes se infectan con *Salmonella* (procedente bien de las heces de la madre o de la contaminación ambiental de la granja). Posteriormente, a lo largo del extenso periodo de transición y el cebo (5 meses aproximadamente) la infección puede mantenerse en la explotación de manera continuada en cerdos asintomáticos mientras se transmite con mayor o menor rapidez a los cerdos sanos.

En el porcino, las vacunas frente a *Salmonella* tienen dos objetivos: uno sería el control de la enfermedad clínica y otro, más importante, la disminución de la excreción de la bacteria en animales infectados subclínicamente, reduciendo de esa manera la diseminación de *Salmonella*. Los estudios previos han mostrado, en general, que la vacunación es efectiva para el control de los síntomas clínicos asociados con los serotipos más patógenos en el cerdo, *S. Choleraesuis* y *S. Typhimurium* (y seguramente su variante monofásica) (Kramer *et al.*, 1992; Maes *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2011). Sin embargo, los resultados no son tan claros cuando lo que se quiere es intentar evitar la excreción en matadero con el fin de proteger a los consumidores de la infección. En este caso, son muchas las cepas y serotipos a controlar y, a menudo, pertenecen a grupos antigénicos diferentes al del antígeno vacunal, surgiendo problemas de protección cruzada (Wales *et al.*, 2017). Este es, quizás, uno de los mayores problemas para el desarrollo de vacunas eficaces en el porcino: la gran diversidad de cepas y serotipos a controlar en esta especie animal. Por ello, en la actualidad, el foco de la vacunación se ha puesto en el control de la excreción de *S. Typhimurium* y su variante monofásica (de la Cruz *et al.*, 2017), los dos serotipos de mayor carácter zoonótico asociados con el cerdo (EFSA, 2018).

Así, en primer lugar, para el control de la infección mediante la vacunación se deben determinar los serotipos que circulan en la explotación y si están presentes en la vacuna disponible. Son varias las estrategias de vacunación que se pueden aplicar en función del tipo de explotación, la edad y las etapas de producción. Por ejemplo, la vacunación en las cerdas reproductoras previamente al parto permitiría reforzar la inmunidad pasiva en los lechones a través del calostro (Roesler *et al.*, 2006; Wales *et al.*, 2011; Ruggeri *et al.*, 2015), mientras que la vacunación de lechones lactantes o en el destete trataría de reducir la transmisión de la infección

a la transición y engorde, o incluso la vacunación de los animales durante periodo de cebo, que tendría el objetivo final de reducir la excreción de *Salmonella* en el matadero (Argüello *et al.*, 2013b).

La evaluación de la efectividad de las vacunas en salmonelosis porcina no es sencilla. Aunque son varios los trabajos publicados al respecto, los resultados obtenidos han sido muy variables (Wales *et al.*, 2011). En uno de los trabajos más recientes (Smith *et al.*, 2017), la vacunación sistemática de madres con una vacuna viva redujo la prevalencia de *Salmonella* en granjas de ciclo cerrado, en todas sus fases de producción y, especialmente, en los cerdos destinados a matadero. También observaron una reducción de la contaminación ambiental por este agente, pero no se vislumbró la eliminación del agente de las explotaciones si no se aplicaban otras medidas de control complementarias. En otro trabajo, de la Cruz *et al.* (2017) analizando los resultados de un gran número de estudios mediante técnicas de meta-análisis, llegan a la conclusión de que la mayoría de ellos muestran un efecto beneficioso, aunque variable, de la vacunación, independientemente del tipo de vacuna (viva o atenuada) y protocolo utilizado (dosis, edad, etc.). De acuerdo con este estudio, la reducción media conseguida en el número de muestras (principalmente heces) con cultivo positivo alcanzaba el 28,6% (IC95%: 22,4-34,7).

En consecuencia, la vacunación frente a *Salmonella* en porcino deberá tener un enfoque diferente al que ha tenido en avicultura, al no ser capaz de alcanzar los mismos porcentajes de reducción de prevalencia. La erradicación de la infección a través solo de la vacunación no será un objetivo viable en la industria porcina, convirtiéndose así en una estrategia adicional más dentro de un programa de control en la explotación, donde el número de acciones preventivas a llevar a cabo para reducir la presión de infección dependerá de la prevalencia en la explotación y de los serotipos presentes.

7.3. Estrategias de alimentación

Tradicionalmente, el uso de antibióticos vía pienso y/o agua ha sido una de las estrategias fundamentales para el control de patógenos entéricos en las diferentes fases de la producción porcina, como la transición y el engorde. Sin embargo, el aumento de resistencias antimicrobianas provocó un cambio de legislación de la UE a principios del presente siglo, con la prohibición de los antibióticos como promotores de crecimiento (Reglamento-CE-1831/2003) y la publicación de guías de uso prudente de antimicrobianos (Anónimo, 2015a). Como consecuencia, en la actualidad el uso de antibióticos en producción porcina se ha vuelto más restrictivo, como muestra la prohibición del uso de colistina como profiláctico y la reducción a 7

días como periodo máximo de administración en granja (EMA, 2016). Por eso es necesario buscar estrategias alternativas para el control de la infección por *Salmonella*. En la actualidad, se están llevando a cabo un gran número de estudios con diferentes estrategias de alimentación para reducir la infección y excreción de *Salmonella*.

Las características físicas del pienso pueden afectar a la prevalencia de *Salmonella*. La granulación del pienso, que conlleva un tratamiento térmico elevado, ha sido utilizada como medida de control de *Salmonella* en los piensos (Edel *et al.*, 1970). Sin embargo, la alimentación con pienso granulado se ha asociado recientemente con una mayor probabilidad de excreción de *Salmonella* y una mayor seroprevalencia (Lo Fo Wong *et al.*, 2004; Hotes *et al.*, 2010; Vico *et al.*, 2012). En este sentido, dietas en harina y con un tamaño de partícula grosero (>3 mm) se han descrito como factores protectores ante la infección, debido a que provocan una mayor acidificación del tracto intestinal (Ball *et al.*, 2011).

La utilización de alimentación líquida fermentable, que permite la disminución del pH en el tracto digestivo, inhibe el crecimiento de enterobacterias y favorece la multiplicación de bacterias ácido-lácticas, beneficiosas para la microbiota intestinal (Missotten *et al.*, 2015). Varios estudios han encontrado una menor prevalencia de *Salmonella* en lotes de cerdos con alimentación líquida (Farzan *et al.*, 2006; Canibe *et al.*, 2012).

Otra estrategia es la administración de probióticos a los animales vía pienso. Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, ayudan al control de la flora intestinal endógena y confieren al huésped un beneficio para la salud (FAO/WHO, 2001). Se administran como probióticos microorganismos como *Lactobacillus* o *Saccharomyces*, que tienen la capacidad de sobrevivir a las condiciones del tracto digestivo y proliferar en el intestino. Varios trabajos han probado su eficacia en el control de *Salmonella*, pero se necesitan más estudios que confirmen los resultados (Barba-Vidal *et al.*, 2018).

La administración de prebióticos es otra alternativa. Los prebióticos se definen como ingredientes no digestibles de los alimentos con un efecto beneficioso para el hospedador mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o varios tipos de microorganismos intestinales (Gibson *et al.*, 1995). Son numerosos los componentes de los alimentos a los que se les han atribuido funciones prebióticas. En general, para considerar un producto como prebiótico, debe cumplir los siguientes requisitos: (a) debe resistir la acidez gástrica, la acción de las enzimas y la absorción intestinal, (b) debe ser fermentable por la microflora del intestino y, (c) debe estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de las

bacterias intestinales asociadas a la salud y el bienestar animal (Gibson *et al.*, 2004). La mayoría de los prebióticos son hidratos de carbono que actúan como sustrato en el crecimiento de bacterias beneficiosas que compiten con la proliferación de *Salmonella* (Delzenne, 2003). Un grupo especial son los oligosacáridos no digestibles, como por ejemplo los fructo-oligosacáridos (FOS) y los galacto-oligosacáridos (GOS), con la capacidad adicional de inhibir la adhesión de enteropatógenos como *Salmonella* a las células del intestino (Wang *et al.*, 2015). Los manano-oligosacáridos (MOS), aunque no son estrictamente considerados como prebióticos, al no estimular selectivamente la microflora beneficiosa del intestino, sí cumplen el resto de criterios que engloban los prebióticos, incluyendo la inhibición de la adhesión de *Salmonella* a los enterocitos (Borowsky *et al.*, 2009), habiendo demostrado resultados prometedores *in vivo* (Andrés-Barranco *et al.*, 2015).

Otras estrategias son la adición en el pienso de extractos naturales de plantas, como los aceites esenciales. Se trata de un grupo de compuestos volátiles obtenidos de las plantas mediante diferentes mecanismos (por vapor o destilación) y con demostrada capacidad antimicrobiana frente a enterobacterias en experimentos *in vitro* (Peñalver *et al.*, 2005; Si *et al.*, 2006). Sin embargo, faltan estudios que confirmen su eficacia *in vivo*.

Por último, una de las estrategias más prometedoras en los últimos años ha sido el uso de ácidos orgánicos. Los estudios *in vitro* han demostrado de forma efectiva su capacidad antimicrobiana (Mroz, 2005). Dado su interés actual, de entre todas las estrategias de alimentación disponibles, los trabajos de esta Tesis Doctoral se han centrado en el estudio con este tipo de aditivos, que se comentan a continuación en el siguiente apartado.

7.3.1. Ácidos orgánicos

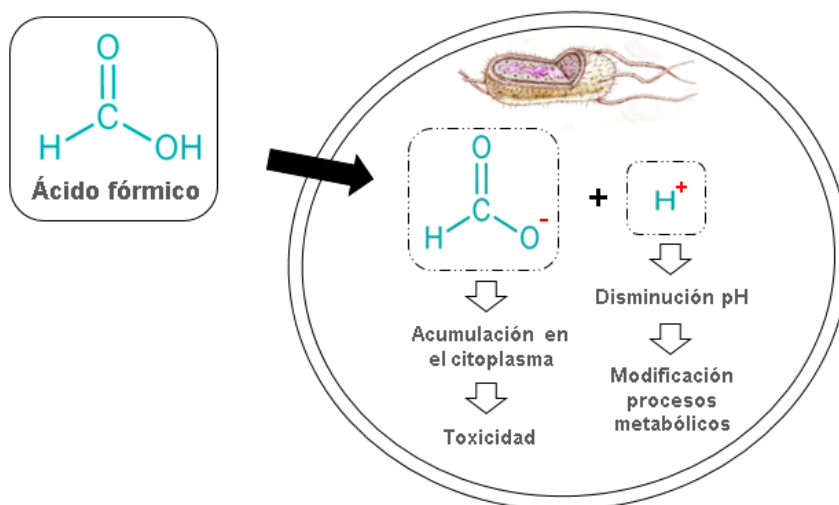
Los ácidos orgánicos son una variedad de ácidos ampliamente distribuidos en la naturaleza en los tejidos de animales y plantas. En química orgánica, se denominan ácidos orgánicos a aquellas sustancias que poseen al menos un grupo funcional carboxilo (-COOH), y que puede alterar la fisiología de las bacterias por su acción bacteriostática y/o bactericida. Son, por lo tanto, compuestos orgánicos y se diferencian de los ácidos inorgánicos por tener átomos de carbono. El grupo carboxilo está compuesto por un átomo de carbono (C) unido mediante un enlace covalente a un átomo de oxígeno (O), y a un radical hidróxilo (OH). Además, el carbono está unido a un radical (R), formado por un compuesto aromático u otro compuesto orgánico (R-COOH), que será el responsable de la nomenclatura propia de cada ácido orgánico. Por esta razón, el nombre químico de los ácidos se basa en el del radical correspondiente (p.ej. ácido etanoico presenta de radical el etanol). El número de átomos de carbono del radical afectará a

las propiedades del ácido. En este sentido, los más utilizados con propiedades antimicrobianas no poseen más de 6 átomos, por lo que se conocen como ácidos grasos de cadena corta (SCFA, *Short Chain Fatty Acids*).

Una de características comunes de estos ácidos orgánicos es su capacidad para disminuir el pH del medio donde se encuentren, inhibiendo la proliferación bacteriana. Sin embargo, lo que ha permitido el uso de ácidos orgánicos como alternativas a los antibióticos (Mroz *et al.*, 2005) ha sido su capacidad antimicrobiana sobre el tracto gastrointestinal de los animales (Partanen *et al.*, 1999). Esta función está promovida por la capacidad de disociación de los ácidos orgánicos en función del pH del ambiente (Partanen *et al.*, 1999). Los SCFA son ingeridos por el cerdo vía pienso y/o agua, y pasan por el tracto digestivo del animal hasta llegar al intestino, donde ejercerán su mecanismo de acción frente a bacterias patógenas Gram negativas como *Salmonella*. Cuando se encuentran en forma no disociada, los ácidos pueden atravesar la membrana semi permeable de la bacteria y alcanzar el citoplasma. Una vez en el interior de la bacteria, con un valor de pH aproximando de 7, el ácido se disociará debido a sus características químicas, provocando la muerte celular por uno o los dos mecanismos descritos a continuación (Figura 7):

- Liberación de protones: la disociación del ácido orgánico provocará la liberación de iones hidrógeno (H^+), disminuyendo el pH del citoplasma celular. Para evitarlo, la bacteria reaccionará poniendo en marcha la bomba de iones de su membrana, consumiendo grandes cantidades de energía. Además, la acumulación de iones afectará a la síntesis de ADN evitando la multiplicación bacteriana.
- Acumulación de la partícula disociada: tras el proceso de disociación, se liberará el anión correspondiente ($R-COO^-$), provocando efecto tóxico en la bacteria debido a su acumulación en el citoplasma.

Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de acción de un ácido orgánico (ácido fórmico) frente a una bacteria de *Salmonella*.



Para que los SCFA puedan ser efectivos frente a patógenos entéricos como *Salmonella*, se precisa que los ácidos alcancen la parte distal del intestino del animal sin ser absorbidos previamente. Para ello, hay que tener en cuenta la constante de disociación ácida (K_a), que se define como una magnitud que cuantifica la tendencia que tienen las moléculas a disociarse en una solución acuosa y marca la fuerza del ácido en una disolución. Debido a los valores que puede alcanzar, para facilitar los cálculos se usa el valor logarítmico de la constante ($\text{p}K_a$). Este valor está matemáticamente relacionado con el pH del medio a través de la ecuación de Henderson-Hasselback (Po *et al.*, 2001) y, en la práctica, significa que cuando el valor de pH del medio es igual al valor de $\text{p}K_a$, el ácido orgánico se encuentra disociado al 50%. Por consiguiente, la efectividad de un ácido orgánico dependerá de ambos parámetros y, de manera general, los ácidos orgánicos de cadena corta con $\text{p}K_a$ elevado tendrían una mayor efectividad antimicrobiana, ya que podrán resistir a la acidez y no disociarse durante su paso por el estómago (Partanen *et al.*, 1999). Pero el pH del intestino también afecta a la disociación del ácido. Generalmente, el pH del lumen del intestino es más elevado ($\text{pH}=6,5-7$) que el $\text{p}K_a$ de los ácidos orgánicos ($\text{p}K_a=3,5-5$). Esto provoca que gran parte de las moléculas de ácidos se disocien en el intestino, por lo que no serán absorbidos por las bacterias patógenas como *Salmonella*. Para solucionar este problema, los ácidos se recubren con microperlas o se encapsulan con productos lipídicos que impiden su disociación en el lumen, aumentando su efectividad (Van Immerseel *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2010). Las propiedades antimicrobianas en el sistema digestivo, junto con otras propiedades como la capacidad de estimulación del crecimiento de

los enterocitos y la reducción de la respuesta inflamatoria (Rossi *et al.*, 2010), hacen que los ácidos orgánicos sean candidatos óptimos como alternativa a los antibióticos usados como promotores del crecimiento.

La lista de ácidos orgánicos aceptados por la UE para su uso en alimentación animal es extensa (Reglamento (CE) 1831/2003 de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal, enmarcados dentro del apartado *Technological additives*), siendo algunos de ellos el ácido acético, butírico, fórmico, láctico o propiónico, compartiendo todos ellos el mecanismo de acción general de los ácidos orgánicos.

A la gran variedad de ácidos disponibles, se une la diversidad de protocolos de actuación y pautas de dosificación existentes, lo que explicaría la gran variabilidad observada en los resultados de eficacia de los estudios *in vivo* publicados (Papenbrock *et al.*, 2005; De Busser *et al.*, 2009; Martín-Peláez *et al.*, 2010; Calveyra *et al.*, 2012; Wilhelm *et al.*, 2012; Walia *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2017; Walia *et al.*, 2017a). En la actualidad, uno de los ácidos orgánicos más estudiados ha sido el ácido butírico. Dada su presentación líquida a temperatura ambiente y su alta capacidad corrosiva, su utilización se hace en formato de sal, lo que permite manejar el producto de una forma más práctica y evitar olores fuertes en la mezcla con el pienso que pueden disminuir el consumo. Por ese motivo, para el desarrollo de los trabajos de esta Tesis Doctoral, se decidió elegir el butirato sódico como ácido orgánico de elección para el estudio de su capacidad antimicrobiana frente a *Salmonella* en porcino.

El butirato sódico es, por lo tanto, un ácido orgánico en formato de sal mediante la adición de sodio (Na) al ácido butírico. A las ventajas de la presentación del aditivo en formato de sal sódica, se une el no depender del pK_a para ejercer su mecanismo de acción, por lo que no se verá afectado por la variación del pH a lo largo del intestino. Sin embargo, estas sales son fácilmente absorbidas en los tramos proximales del intestino, con un efecto positivo sobre la mucosa del intestino al ser fuente de energía para los enterocitos (Kotunia *et al.*, 2004). Esta rápida absorción podría evitar la propiedad antimicrobiana directa frente a *Salmonella* en las partes más distales del intestino, por lo que las generaciones siguientes de este ácido se han basado en la protección mediante técnicas de encapsulamiento.

8. El control de *Salmonella* en porcino en la UE

Durante la década de los años 50 varios brotes alimentarios en Suecia, originados por *Salmonella* y relacionados con la contaminación de productos de origen animal, provocaron una alarma en Salud Pública (Lundbeck *et al.*, 1955). Como consecuencia, este país fue el primero en Europa que inició un programa nacional de control de *Salmonella*, aplicando medidas específicas para el control de esta zoonosis en porcino, avicultura y rumiantes (Wierup, 2006). El objetivo del programa sueco fue comercializar productos para consumo humano libres de *Salmonella*, y se basó para ello en la prevención de la contaminación por esta bacteria a lo largo de toda la cadena de producción alimentaria. Los Servicios Veterinarios aplicaron estrictos controles sanitarios en las explotaciones porcinas y supervisaron los movimientos de animales, considerando una granja negativa a *Salmonella*, y por lo tanto libre de las restricciones, cuando presentaba dos resultados bacteriológicos negativos en todos los animales muestreados con un mes de intervalo. La mayoría de los costes preventivos (97%) y la mitad de los costes de erradicación de animales portadores (48%) fueron sufragados directamente por los granjeros, motivando de esta forma a los ganaderos en la aplicación de las medidas preventivas y consolidando así la eficacia del programa sueco de control de *Salmonella*.

Posteriormente, otros países escandinavos siguieron la misma idea. Un buen ejemplo fue Dinamarca, uno de los mayores países exportadores en producción porcina de la UE en los años noventa, que empezó su propio programa nacional de control de *Salmonella* porcina en el año 1995 (Mousing *et al.*, 1997). El programa danés se basó en el análisis serológico mediante un test ELISA para la detección de anticuerpos frente a *Salmonella* (en comparación con la bacteriología empleada en el programa sueco). El muestreo se llevaba a cabo en los mataderos, donde se recogía el músculo diafragmático de los cerdos a través de un muestreo aleatorio estratificado. Posteriormente, se obtenía el jugo muscular para la realización de la prueba de ELISA y obtener los resultados serológicos en forma de porcentaje de Densidad Óptica (%DO). Se eligió un punto de corte elevado ($\%DO \geq 40$) para considerar un animal seropositivo. Esto permitía clasificar las granjas origen de los cerdos sacrificados en 3 niveles de riesgo de infección por *Salmonella* en función de la estimación ponderada de la seroprevalencia obtenida en los tres últimos muestreos: Nivel 1 (seroprevalencia $<10\%$) de bajo riesgo, Nivel 2 (seroprevalencia entre el 10% y el 50%) de riesgo medio y Nivel 3 (seroprevalencia $\geq 50\%$) de alto riesgo. Como resultado, los Servicios Veterinarios Oficiales de Dinamarca instaban a las granjas de Nivel 2 y 3 a tomar medidas preventivas para reducir la prevalencia de infección de los cerdos, incluyendo el sacrificio logístico para las granjas de Nivel 3. El objetivo de estas medidas era disminuir el número de granjas con Nivel 2 y, sobre todo, con Nivel 3. Este objetivo se consiguió en marzo

de 1997, cuando se redujo significativamente el número de granjas de Nivel 3 ($P=0.011$), asociado parcialmente a la puesta en marcha del programa danés de control (Emborg *et al.*, 1997).

A finales del siglo XX, a raíz de diversos brotes de origen alimentario, la UE consideró que la prevención y control de enfermedades zoonóticas como la salmonelosis debía ser un acto coordinado entre los Estados Miembros, con el objetivo de proteger la salud humana y la transmisión de enfermedades. Por esa razón, el 17 de diciembre de 1992 se aprobó la Directiva 92/117/CEE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos de origen animal, a fin de evitar el brote de infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos (Anónimo, 1992). En ella se establecían mecanismos de vigilancia de determinadas zoonosis y medidas de control específicas para la infección por *Salmonella*. A raíz de la Directiva, los Estados Miembros empezaron a trabajar en planes de vigilancia y medidas de control para evitar la introducción de *Salmonella* en las explotaciones, junto con un sistema de recopilación y monitorización de datos.

Sin embargo, años más tarde, en un dictamen sobre las zoonosis aprobado por la Comisión Europea (CE) el 12 de abril de 2000, el Comité Científico de Medidas Veterinarias relacionadas con la Salud Pública consideró que, hasta el momento, las medidas en vigor para controlar las infecciones zoonóticas de origen alimentario eran insuficientes. También consideró este Comité, que los datos epidemiológicos que estaban recogiendo los Estados Miembros eran incompletos, además de no ser totalmente comparables. Por lo tanto, el Parlamento Europeo consideró necesario mejorar los sistemas de control de los agentes zoonóticos, y aprobó la Directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, que derogaría la Directiva anterior 92/117/CEE del Consejo (Anónimo, 2003a). Posteriormente, el 17 de noviembre de 2003 se aprobó el Reglamento (CE) nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos (Anónimo, 2003b). Este Reglamento se convirtió en la base de las medidas de control frente a *Salmonella* de los Estados Miembros que abarcarían actuaciones en toda la cadena alimentaria, de la granja hasta la mesa. Además, el reglamento 2160/2003 pretendía establecer un programa de monitorización armonizado frente a *Salmonella* en los Estados Miembros, de manera que todos los países debían entregar los datos referentes a los programas de monitorización frente a *Salmonella* en cerdas reproductoras y cerdos de engorde en los siguientes 18 meses. Posteriormente, se publicarían dos informes generales con los resultados de esa monitorización.

De forma paralela, a partir del 1 de enero de 2006, todos los Estados Miembros están obligados a informar de los datos de casos de salmonelosis humana (junto con otras zoonosis) como consecuencia del Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Anónimo, 2005). Gracias a ello, la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés -*European Food Safety Authority*-) publica desde entonces un informe anual descriptivo que permite el seguimiento de las tendencias de las zoonosis en la UE. Es a partir de entonces cuando se determina que la especie porcina sería la 2ª fuente de infección de salmonelosis en humanos, tras la avicultura.

Sin embargo, antes de proponer medidas específicas de control de esta zoonosis para cada país, en el año 2006 la Comisión Europea realizó una Consulta a la EFSA a raíz de la nueva Regulación (CE) nº 2160/2003. El Panel Científico sobre Riesgos Biológicos (en inglés, *Scientific Panel on Biological Hazards*) de la EFSA publicó una Opinión Científica relacionada con el análisis de riesgo y las diferentes opciones para mitigar la *Salmonella* en producción porcina (EFSA, 2006). Las conclusiones fueron que el control de *Salmonella* debe llevarse a cabo en toda la cadena de producción, y que las medidas preventivas que se apliquen deben estar orientadas a (1) evitar la introducción de la *Salmonella* en la explotación, (2) prevenir la transmisión de la enfermedad entre los animales y (3) aumentar la resistencia a la infección en los animales. Debido a este informe de la EFSA, se determinó que la estrategia idónea de control se basaría en una combinación de medidas para prevenir la transmisión de la infección. Además, se puso de manifiesto las diferencias entre la bacteriología y la serología como métodos de monitorización de la infección, por obtener resultados diferentes no comparables entre sí. Por ello, la elección de un método u otro dependerá del objetivo del programa de monitorización. La bacteriología permitirá obtener información del estatus individual de los animales y de los serotipos circulantes junto con los perfiles de resistencia antimicrobiana. En cambio, la serología permitirá el estudio de grandes cantidades de muestras a nivel de rebaño, por lo que es considerada como idónea para controlar la efectividad de los programas de control.

EFSA publicó en el año 2008 el primer informe de los estudios de prevalencia de *Salmonella* en cerdos de matadero a nivel europeo unificando la información recabada por los Estados Miembros durante los años 2006 y 2007 (EFSA, 2008) y mostrando datos comparables sobre prevalencia de *Salmonella* de todos los Países. El estudio se basó, principalmente, en la toma de muestras de nódulos linfáticos íleo-cecales en el matadero, siendo *S. Typhimurium* y *S. Derby* los dos serotipos más frecuentes (40% y 14,62% respectivamente). La proporción media de animales en los que se aislaba *Salmonella* en nódulos linfáticos (10,3%) fue muy variable

entre los países participantes (entre 0-29%), siendo España el país con mayor prevalencia (29%). El informe concluyó identificando a los cerdos infectados por *Salmonella* como posible factor de riesgo en la contaminación de la carne y origen de la infección en humanos, por lo que se recomendaba el estudio de la epidemiología de la infección y consideraba fundamentales las intervenciones a nivel de granja y matadero para un control óptimo de la infección.

Un año más tarde, la EFSA publicó un segundo informe acerca de la prevalencia de *Salmonella* en cerdas reproductoras en la UE, dividido en dos partes: Parte A, *Salmonella prevalence estimates* (EFSA, 2009) y Parte B, *factors associated with Salmonella pen positivity* (EFSA, 2011). La prevalencia en las cerdas reproductoras en este informe varió significativamente (0-64%) entre los países participantes (EFSA, 2009), al igual que en el estudio a nivel de nódulos linfáticos previo. Cabe destacar la mínima cantidad de aislamientos en cerdas reproductoras (0%) en varios países nórdicos (a excepción de Dinamarca) en consonancia con los resultados obtenidos en nódulos linfáticos del anterior informe, fruto del éxito de los programas nacionales de control puestos en marcha en esos países a finales del siglo pasado. La proporción media de cerdas reproductoras positivas a *Salmonella* fue del 31,8%, siendo España el país líder en detección de la bacteria con un 64%. Los dos serotipos más frecuentes fueron *S. Derby* y *S. Typhimurium* (23,9% y 17,9% respectivamente). La principal conclusión del estudio fue que el elevado índice de aislamiento de *Salmonella* en cerdas reproductoras podría ser un factor de riesgo para la diseminación de la bacteria a las siguientes fases de producción porcina. De esta manera, se instaba a tomar medidas con el objetivo de controlar la infección a este nivel y evitar la contaminación de la carne y posible infección en humanos.

El Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Anónimo, 2005) también incluía un criterio de higiene obligatorio para la *Salmonella* en las canales porcinas a fin de controlar la contaminación durante el sacrificio en el matadero, a través de la toma de muestras en la superficie de las canales después de su faenado pero antes del enfriamiento. En 2014 esta legislación europea fue revisada a través del Reglamento (CE) nº 217/2014 relativo a la *Salmonella* en las canales porcinas (Anónimo, 2014). Se modificó el criterio de aceptación de contaminación de las canales, aceptando un máximo de 3 canales positivas de 50 (6%), frente a un máximo de 5 canales positivas de 50 (10%) en el anterior Reglamento de 2005. El objetivo de esta modificación era fortalecer la higiene en el proceso de sacrificio, obligatorio para todos los Estados Miembros de la UE.

Como consecuencia de la Legislación Europea puesta en marcha en la última década del siglo XX, la incidencia de *Salmonella* se redujo en humanos un 50% en el periodo 2004-2009,

pero asociada principalmente a una caída significativa de la prevalencia de *Salmonella* en avicultura, fuente principal de la salmonelosis en humanos (Ballesté-Despierre *et al.*, 2016).

8.1. Programas nacionales de control de *Salmonella* en porcino en la UE

Toda esta legislación europea instaba a los Estados Miembros a la implementación de programas de control frente a *Salmonella* a lo largo de la cadena de producción porcina. Algunos países, siguiendo en muchos casos la estela de Dinamarca, implementaron programas de control en las explotaciones con mayor o menor éxito. Revisaremos a continuación los programas de aquellos países que implementaron algún tipo de plan.

8.1.1. Dinamarca

Como ya se comentó, Dinamarca inició su programa de control de la salmonelosis porcina en 1995. Cinco años después de su lanzamiento realizó un seguimiento de los resultados obtenidos (Alban *et al.*, 2002). Se observó que la incidencia de salmonelosis humana asociada al consumo de carne de cerdo había descendido desde los 1.100 casos en el año 1993 hasta 166 casos en el año 2000 (Anónimo, 2001; Alban *et al.*, 2002) y a 77 casos en el año 2002 (Anónimo, 2003c). A pesar de haber alcanzado esta significativa reducción, se decidió reajustar el programa para hacerlo más efectivo. Entre otras acciones, se definieron nuevos tamaños de muestra en función del tamaño de las granjas, se cambiaron los puntos de corte en los análisis serológicos (fue rebajado a un %DO \geq 20) y se modificaron los límites de los niveles de clasificación de las explotaciones, incluyendo un nuevo nivel 0 asociado a explotaciones con niveles de seroprevalencia de *Salmonella* muy bajos (\leq 5%). Esta nueva clasificación permitió una detección más temprana de niveles crecientes de seroprevalencia en una explotación, pudiendo implementar medidas de control más rápido. Debido a los elevados costes del programa, se incluyeron penalizaciones económicas para las granjas de nivel 2 y 3, descontando entre un 3% y un 9% sobre el valor del precio de la canal respectivamente, por lo que el motivo económico fue un buen aliciente para que los ganaderos se esforzaran en la prevención de la infección en las explotaciones (Alban *et al.*, 2010).

En los años posteriores, el programa danés continuó reajustando los límites de clasificación de las explotaciones para optimizarlos (Alban, *et al.*, 2012). Esto permitía que una granja con elevados niveles de *Salmonella* cambiara de nivel tan pronto como aplicara medidas de control efectivas y también que disminuyeran las sanciones asociadas a las granjas de los niveles 2 y 3, por lo que los ganaderos vieron recompensado su esfuerzo económico. Como consecuencia de las medidas de control y prevención llevadas a cabo a lo largo de la cadena productiva, en el año 2009 Dinamarca alcanzó una incidencia de 3 casos de salmonelosis

asociados al cerdo por 100.000 habitantes (Anónimo, 2010) y, en la actualidad, esa cifra ha descendido hasta 1,5 casos por 100.00 habitantes (Anónimo, 2018).

8.1.2. Irlanda

En el año 1997, Irlanda implantó un programa voluntario de control de *Salmonella* que se llevó a cabo en un reducido número de explotaciones (Quirke *et al.*, 2001). Mediante el análisis de jugo muscular a través de la técnica ELISA, se establecía una clasificación de las granjas en función de la seroprevalencia (Categorías I, II y III, de menor a mayor riesgo). El objetivo de este programa fue estudiar la relación entre la contaminación por *Salmonella* de las canales y el estatus serológico de las granjas origen de los cerdos. Los resultados del modelo obtenido permitieron concluir que las canales procedentes de las granjas de alto riesgo (Categoría III) estaban significativamente más contaminadas por *Salmonella* a nivel superficial y a nivel de contenido cecal. Sin embargo, estas conclusiones debían tomarse con precaución, debido al escaso número de animales muestreados. Como consecuencia, Irlanda puso en marcha de manera oficial un programa obligatorio nacional de control de *Salmonella* en el año 2002, basado en la categorización de las explotaciones, con el objetivo de reducir la prevalencia de *Salmonella* en la cadena de producción y en la carne de cerdo. Este programa fue revisado en el año 2010 (Argüello *et al.*, 2018). El nuevo programa, en vez de clasificar las explotaciones, otorga un “sello de garantía” sanitaria frente a *Salmonella*. Para ello, se recogen de forma mensual 6 muestras de suero de cerdos de cada granja y se estima la seroprevalencia ponderada con los resultados de los últimos tres meses. En caso de que una explotación presente $\geq 50\%$ de animales seropositivos, la granja pierde el sello y debe tomar medidas preventivas para corregir la situación, incluyendo el sacrificio logístico y muestreos bacteriológicos en el matadero para conocer la contaminación de las canales (Argüello, 2013c; Walia, 2017b). Sin embargo, no hemos encontrado datos publicados que demuestren la eficacia de este enfoque.

8.1.3. Austria

El país austríaco implementó un programa de monitorización de *Salmonella* desde el año 1999 hasta el año 2003 (Köfer *et al.*, 2006). El objetivo fundamental fue obtener una visión general del estatus de infección por *Salmonella* en la cabaña porcina. Se llevaron a cabo muestreos periódicos de jugo muscular procedentes de la casi totalidad de granjas de cebo del país (más de 3.000 granjas) en 5 mataderos. Las granjas se clasificaban como positivas o negativas frente a *Salmonella* en función de la seroprevalencia obtenida mediante un ELISA (punto de corte de $\%DO \geq 40$, que se redujo a un $\%DO \geq 20$ a partir del año 2002). Como consecuencia, a las granjas positivas se les hacía una investigación epidemiológica. El programa también incluía muestreos en los mataderos, para análisis bacteriológico de distintas superficies

y de muestras de carne fresca. Los resultados del programa fueron satisfactorios, debido a que más del 95% de las granjas analizadas fueron seronegativas en el periodo de estudio (1999-2003), mientras que solo 4 muestras bacteriológicas fueron positivas a *Salmonella*. A pesar de no continuar con el programa de manera oficial, entre los años 2006-2009 la detección de *Salmonella* en nódulos linfáticos mesentéricos se mantuvo baja (2%), y solo el 1,1% de las canales porcinas fueron positivas a *Salmonella* (Kostenzer *et al.*, 2014). A su vez, la prevalencia en granja se estimó en <9,5%, por lo que los resultados confirmaban que Austria permanecía por debajo de la media europea de prevalencia frente a *Salmonella*.

8.1.4. Alemania

En el año 2002, la industria de producción animal en Alemania puso en marcha un programa voluntario de control de *Salmonella* en producción porcina englobado dentro del Sistema de Calidad y Seguridad alemán (*Quality and Safety System -QS-System*) (Osterkorn *et al.*, 2001; Blaha, 2004). El programa pasó a ser obligatorio a partir del año 2007 para la industria porcina del país y se basaba en el muestreo de suero sanguíneo (recolectado dentro de las dos semanas antes del sacrificio) o de jugo muscular (en matadero) de 60 cerdos por granja y año, para analizarlos posteriormente con un ELISA (Blaha, 2003; De Ridder, 2014; Gotter *et al.*, 2012). Las granjas se clasifican en 3 categorías de riesgo en función de la seroprevalencia (punto de corte %DO \geq 40): bajo riesgo (Categoría I, \leq 20% seroprevalencia), riesgo medio (Categoría II, 20-40%) y alto riesgo (Categoría III, \geq 40%). En caso de encontrar una seroprevalencia elevada (>20%), las granjas deben implementar medidas para el control de la infección y, en determinadas situaciones, se impone el sacrificio de animales de granjas de alto riesgo. En caso de no establecer las medidas correctoras, se imponen sanciones económicas a los ganaderos y las granjas son excluidas del *QS System*, limitando así la comercialización de sus productos con el correspondiente impacto económico. El objetivo inicial de Alemania era reducir el número de explotaciones de Categoría III a través de la implantación de las medidas de control.

Sin embargo, a pesar de que se consiguió que un número importante de granjas de Categoría III redujeran la seroprevalencia y cambiaran de categoría de riesgo, el programa no consiguió prevenir que algunas explotaciones de Categoría I y II aumentaran su nivel de seroprevalencia, por lo que la frecuencia global de granjas de alto riesgo no ha variado significativamente desde el inicio del programa (Blaha, 2017). A raíz de los resultados poco satisfactorios del programa, Alemania está planteando la eliminación de los límites entre las tres categorías de riesgo junto con la aplicación rutinaria de medidas de reducción de *Salmonella* en todas las explotaciones porcinas (Blaha, 2017).

8.1.5. Reino Unido

En el año 2002, la industria porcina del Reino Unido (*British Pig Executive*, BPEX) implementó un programa voluntario de control de *Salmonella* en porcino englobado dentro del Plan General de Zoonosis (*Zoonoses Action Plan*, ZAP). El objetivo de este programa fue identificar las granjas con elevados niveles de anticuerpos frente a *Salmonella* para poder aplicar medidas preventivas, mejorando la seguridad alimentaria de los productos de origen porcino (Snary *et al.*, 2010). El programa consistía en el análisis mediante ELISA de al menos 15 muestras de jugo muscular de cerdos sacrificados durante 3 meses consecutivos. El nivel de riesgo de las explotaciones en función de su seroprevalencia fue medido en S/P ratio, que relaciona el valor de densidad óptica de cada muestra en relación a un control positivo. El punto de corte escogido para clasificar a una granja positiva fue un valor de S/P ratio ≥ 0.25 y se clasificaron en 3 niveles de riesgo: ZAP1 (seroprevalencia $< 50\%$) en el que no se tomaban medidas preventivas, ZAP2 (seroprevalencia entre $\geq 50-75\%$) y ZAP3 (seroprevalencia $\geq 75\%$). Inicialmente el programa no tendría costes para los ganaderos durante los 3 primeros años (el gobierno del país apoyaba económicamente el inicio del proyecto), pero las granjas con seroprevalencia $\geq 50\%$ (ZAP 2 y 3) debían de desarrollar un plan de acción para reducir la *Salmonella*, asesoradas por consultores expertos del sector. En el año 2008, el punto de corte se modificó hasta un S/P ratio ≥ 0.10 (cuando entró en vigor el *Zoonoses National Control Programme*, ZNCP), variando ligeramente los límites de los tres niveles de clasificación de las granjas (Snary *et al.*, 2010). Debido a que los niveles medios de seroprevalencia frente a *Salmonella* no disminuyeron significativamente, el programa fue suspendido en el año 2012 (Anónimo, 2012), y las sanciones económicas propuestas no llegaron a efectuarse nunca. Como sustitución se aplicó un programa de evaluación de riesgos en la explotación, basado en un sistema de puntuación sobre bioseguridad, con el objetivo de mejorar la sanidad y reducir el riesgo de contaminación por *Salmonella* de la carne. De esta manera, se pretende que el uso de medidas preventivas frente a la *Salmonella* en granja estimule a los ganaderos en la lucha contra la infección (Marier *et al.*, 2016).

8.1.6. Holanda

Los Países Bajos comenzaron un programa obligatorio de monitorización de *Salmonella* en porcino en el año 2005, basado igualmente en categorizar las explotaciones en función de resultados de seroprevalencia (Hanssen *et al.*, 2007). El programa consistía en el análisis mediante ELISA de un total de 36 muestras de suero al año de cada granja, bien 12 muestras cada 4 meses (tres semanas antes del sacrificio) o bien en el matadero (el día del sacrificio). Cada 4 meses las granjas eran clasificadas en 3 niveles de puntuación según la seroprevalencia (punto

de corte %DO \geq 40): nivel 1 (\leq 20% seroprevalencia = 1 punto), nivel 2 (20-40% = 2 puntos) y nivel 3 (\geq 40% = 3 puntos). A final del año, se sumaban los niveles de puntuación de los 3 muestreos anuales (36 muestras) y se clasificaban las granjas en 3 categorías: Categoría 1 (nº total de puntos = 3-4), Categoría 2 (nº total de puntos = 5-7) y Categoría 3 (nº total de puntos = 8-9), correspondientes con granjas de bajo, moderado y alto riesgo de infección por *Salmonella* respectivamente. Se instaba a las granjas de Categoría 3 a tomar medidas preventivas para el control de la *Salmonella*, a pesar de que no se instauraron penalizaciones económicas a menos que las granjas no cumplieran con el protocolo de muestreo establecido (De Ridder, 2014). En el año 2006, el 4% de las granjas analizadas se englobaron dentro de la Categoría de alto riesgo (Hanssen *et al.*, 2007). El programa no consiguió reducir significativamente el número de explotaciones de alto riesgo, ya que en el año 2010 el 5% de las explotaciones fueron incluidas en la Categoría 3 (Hassen, 2011). Desde el año 2013, la gestión del programa se transfirió a dos sistemas de calidad holandeses que no ofrecen resultados públicos del seguimiento (Van der Wolf, 2017). En la actualidad solo algunos mataderos alemanes imponen sanciones económicas a cerdos procedentes de granjas holandesas de Categoría 3, entre 0,03 y 0,015 € por kilo de canal (Van der Wolf, 2017), haciendo presión a los ganaderos holandeses para tomar medidas para el control de la infección por *Salmonella* antes del sacrificio.

8.1.7. Bélgica

En el año 2005, Bélgica inició un programa de monitorización y control de *Salmonella* en cerdos con el objetivo de identificar las granjas con mayor riesgo de seroprevalencia frente a *Salmonella* (Méroc *et al.*, 2012). Cada 4 meses se analizaban 12 muestras de suero procedentes de animales de cebo representativas de todas las edades. A partir del año 2007, todas las explotaciones que presentaban un valor medio de S/P ratio \geq 0,6 en los 3 muestreos consecutivos (36 muestras) eran consideradas granjas de alto riesgo, por lo que debían implementar un plan de medidas preventivas para reducir el riesgo de infección en la granja, además de realizar un control bacteriológico en muestras fecales durante el cebo. No se aplicaron penalizaciones económicas a las granjas en las que se aisló *Salmonella* (De Ridder, 2014). Adicionalmente, en el matadero las partidas de cerdos procedentes de estas granjas, eran identificadas y se sacrificaban al final del día todas juntas. Debido a que no hubo una reducción significativa de la seroprevalencia en la producción porcina del país, el programa se suspendió en el año 2015, manteniendo únicamente una asesoría veterinaria en las granjas porcinas y la supervisión de las medidas preventivas frente a la infección (Meroc *et al.*, 2012; Brossé, 2015).

8.1.8. España

Los esfuerzos para controlar la salmonelosis porcina en las explotaciones han sido escasos. En el año 2016, las asociaciones catalanas de producción porcina (Innovacc, Fecic, Asfac y Porcat) pusieron en marcha una certificación voluntaria para explotaciones y mataderos, dentro del Programa de control de *Salmonella* en Porcino (PSP) (Anónimo, 2015b). La monitorización de *Salmonella* se debía llevar a cabo mediante el uso de la serología más la realización de auditorías para verificar el cumplimiento de los requisitos de bioseguridad en la explotación. Sin embargo, a fecha de hoy, no hay datos publicados acerca de la eficacia y continuidad de este programa voluntario.

A parte de la monitorización oficial de las canales porcinas recogida en la Directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos (Anónimo, 2003a), es obligatorio el seguimiento de lotes de animales sacrificados en mataderos. En el 2017, en España se recogieron 384 muestras fecales (*pooles*) procedentes de 18 mataderos que representaban el 60,66% del volumen total de los cerdos sacrificados en España. Casi la mitad de las muestras analizadas (48,9%) fueron positivas a *Salmonella* (EFSA, 2017b), poniendo en evidencia la elevada prevalencia de la infección en España.

En conclusión, aunque tras la implementación de estos programas se alcanzaron inicialmente algunos progresos, la realidad es que, a excepción de los países escandinavos, ninguno de los demás países europeos ha registrado mejoras significativas en la reducción de la infección por *Salmonella* en cerdos de engorde o en el número de casos humanos atribuidos al cerdo o al consumo de productos de origen porcino. Esta ha sido una de las principales razones por las que los países que inicialmente habían implantado estos programas hayan decidido suspenderlos o modificar significativamente sus características iniciales. Solo Irlanda y Alemania, junto con los países nórdicos, siguen a día de hoy con programas de seguimiento y control frente a *Salmonella* en las explotaciones porcinas.

A pesar de que cada país aplicó una gestión diferente del programa, todos ellos estaban basados en el “modelo danés”. Este modelo se centra en el uso de las pruebas serológicas como piedra angular para la clasificación del riesgo de infección por *Salmonella* de las explotaciones porcinas, bien sea a partir de muestras de suero sanguíneo (generalmente obtenido en las granjas) o, mayoritariamente, de jugo muscular (matadero). Sin embargo, varios estudios ya han puesto en evidencia la limitada precisión diagnóstica de las pruebas serológicas para la detección de la salmonelosis a nivel individual, así como la falta de correlación entre resultados serológicos y microbiológicos (Funk *et al.*, 2005; Nollet *et al.*, 2005a; Farzan *et al.*, 2007; Vico *et*

al., 2010; Methner *et al.*, 2011). También están demostradas las discrepancias entre el uso de distintos kits de ELISA y entre las diferentes matrices (suero y jugo muscular) usadas (Mejía *et al.*, 2005; Farzan *et al.*, 2007; Mainar-Jaime *et al.*, 2008; Vico *et al.*, 2011a). Por lo tanto, son varios los posibles sesgos cometidos cuando se emplea la serología en individuos y se extrapolan los resultados a nivel de explotación, lo que probablemente esté ocasionando que no sean estos métodos de diagnóstico los más idóneos para la categorización del riesgo de las granjas (Sørensen *et al.*, 2004; Vico *et al.*, 2010; Gradassi *et al.*, 2015).

Un problema añadido ha sido, a nuestro entender, tanto el pequeño tamaño de muestra usualmente considerado (entre 36 y 100 cerdos por explotación y año, según país), como la falta de representatividad de los animales con respecto a su distribución en las explotaciones (los cerdos son seleccionados mayoritariamente en el matadero, no en las naves de la explotación). Considerando además la variabilidad de una infección como es la salmonelosis porcina, no solo entre corrales y lotes de cebo, sino también a lo largo del año, todos estos factores contribuyen a aumentar el sesgo.

Por último, no hay duda de que los factores intrínsecos de cada país han acabado contribuyendo a la heterogeneidad de los resultados obtenidos en la aplicación de los programas de control. Las Administraciones Sanitarias de los países nórdicos tuvieron una elevada implicación en la implantación de los programas, aplicando importantes sanciones económicas en función del nivel de riesgo de las granjas. Sin embargo, la producción porcina en estos países es, en general, menor, más concentrada y más homogénea que en los países del centro y sur de Europa. Por ello, las características de la producción porcina de los países nórdicos no son directamente extrapolables a otros países europeos como España o Alemania, con un territorio muy extenso y un gran censo porcino distribuido a lo largo de todo el país.

El escaso éxito de los programas de control en la mayoría de los países que los han puesto en marcha, sin duda hace necesario plantear el desarrollo de nuevos programas más acordes con las características de la infección y de los países donde se quieren llevar a cabo, y también con el objetivo final de estos, que no es sino la reducción de la infección en la población humana.

III. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue profundizar en el conocimiento sobre la epidemiología de la infección por *Salmonella* en el ganado porcino con el fin de implementar nuevas estrategias de control que permitan reducir la incidencia de salmonelosis tanto en las explotaciones porcinas como en la población humana. Para ello se estudiaron distintos aspectos de la dinámica de infección por *Salmonella* relacionados con dos etapas concretas del ciclo de producción porcina: el periodo de destete y el de cebo.

Como objetivos más específicos, se plantearon los siguientes:

- I. Evaluar la posibilidad de predecir el riesgo de excreción de *Salmonella* en los cerdos que llegan al matadero a través del estudio del estatus de infección en la explotación durante el periodo de cebo, con el fin de poder aplicar medidas de control con antelación suficiente al sacrificio.
- II. Estudiar la eficacia de la administración en el pienso de butirato sódico durante la fase de cebo para reducir la infección y excreción de *Salmonella* de los cerdos destinados a matadero.
- III. Cuantificar y caracterizar la infección por *Salmonella* en lechones destetados (4 semanas de vida) procedentes de granjas de cerdas reproductoras con una elevada seroprevalencia frente a *Salmonella*.

IV. TRABAJOS PUBLICADOS

PUBLICACIÓN I / PUBLICATION I

Influence of on-farm pig *Salmonella* status on *Salmonella* shedding at slaughter

Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C.

Zoonoses and Public Health 2017, 64(5):328-336

ORIGINAL ARTICLE

Influence of On-farm pig *Salmonella* status on *Salmonella* Shedding at Slaughter

A. Casanova-Higes¹, S. Andrés-Barranco¹ and R. C. Mainar-Jaime²

¹ Unidad de Producción y Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2- (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, Spain

² Dpt. de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón -IA2- (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain

Impacts

- A significant proportion of *Salmonella* non-infected pigs may end up shedding *Salmonella* at slaughter likely due to their exposure to highly contaminated environments (trucks, lairage area).
- The probability of shedding *Salmonella* at slaughter is significantly higher for pigs already infected at farm compared to non-infected pigs or pigs infected just before slaughter.
- For a *Salmonella*-infected pig, the likelihood of shedding *Salmonella* at slaughter would be significantly greater if *Salmonella* has colonized the mesenteric lymph nodes.

Keywords:

Epidemiology; pulsed-field gel electrophoresis; pigs; *Salmonella*; shedding; slaughter

Correspondence:

R. C. Mainar-Jaime. Dpt. de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón -IA2- (Universidad de Zaragoza-CITA), Avda. Miguel Servet, 177. 50013, Zaragoza, Spain. Tel.: +34 976762088; Fax: +34 976761612; E-mail: rcmainar@unizar.es

Received for publication January 26, 2016

doi: 10.1111/zph.12301

Summary

The risk of *Salmonella* shedding among pigs at slaughter with regard to their previous on-farm *Salmonella* status was assessed in a group of pigs from a farm from NE of Spain. A total of 202 pigs that had been serologically monitored monthly during the fattening period and from which mesenteric lymph nodes (MLN) and faecal (SFEC) samples were collected at slaughter for *Salmonella* isolation were included. A repeated-measures ANOVA was used to assess the relationship between mean OD% values during the fattening period and sampling time and bacteriology on MLN and SFEC. Pigs were also grouped into four groups, that is pigs seronegative during the fattening period and *Salmonella* negative in MLN (group A; $n = 69$); pigs seronegative during the fattening period but *Salmonella* positive in MLN (B; $n = 36$); pigs seropositive at least once and *Salmonella* positive in MLN (C; $n = 50$); and pigs seropositive at least once but *Salmonella* negative in MLN (D; $n = 47$). Pigs shedding at slaughter seroconverted much earlier and showed much higher mean OD% values than non-shedders pigs. The proportion of *Salmonella* shedders in groups A and D was high and similar (26.1% and 29.8%, respectively), but significantly lower than that for groups B and C. The odds of shedding *Salmonella* for groups B and C were 4.8 (95% CI = 1.5–15.5) and 20.9 (3.7–118) times higher, respectively, when compared to A. It was concluded that a large proportion of *Salmonella* seronegative pigs may shed *Salmonella* at slaughter, which would be likely associated to previous exposure with contaminated environments (i.e. transport and lairage). For pigs already infected at farm, the likelihood of shedding *Salmonella* was much higher and may depend on whether the bacterium has colonized the MLN or not. The odds of shedding *Salmonella* spp. were always much higher for pigs in which *Salmonella* was isolated from MLN.

Introduction

Pigs are considered the second most common source of human salmonellosis (Pires et al., 2011; de Knecht et al., 2015), the second most important zoonosis in the EU transmitted through the consumption of food after campylobacteriosis (EFSA and ECDC, 2015). *Salmonella* is a ubiquitous bacterium able to infect a wide range of animal species but also to survive out of the animal reservoir for long periods. In pig production, the environmental contamination of the farm, originated either from infected pigs or from contaminated feed, vehicles, dirty boots, aisles, wildlife, etc. contribute significantly to the *Salmonella* infection of pigs (Fosse et al., 2009; Vico et al., 2011; Gotter et al., 2012; Andrés-Barranco et al., 2014a), and the contamination of the fattening unit appears as a critical point for *Salmonella* infection of slaughter pigs (Blaha, 2010).

The role that infected pigs may have on carcass contamination at slaughter is not clear (Berends et al., 1997). The likelihood of a pig carcass being contaminated with *Salmonella* has much to do with the intrinsic abattoir characteristics and the two major sources of *Salmonella* within the slaughtering facility: (i) the already contaminated slaughter environment and (ii) the inputs of *Salmonella* introduced by contaminated or infected pigs (Argüello et al., 2013). In general, cross-contamination levels at slaughter are considered high and improved slaughter practices are required to reduce them (see review in Argüello et al., 2013).

Pigs arriving to the slaughter usually show a higher likelihood of shedding *Salmonella* than control pigs remaining at the farm (Berends et al., 1997; Hurd et al., 2002; Beloeil et al., 2004). This may be partly associated with the presence of *Salmonella* carrier pigs that begin shedding after being exposed to stress-associated events such as the transport or after being mixed with pigs from different batches either at the truck or at lairage (Rostagno et al., 2003; Scherer et al., 2008). In addition, non-infected pigs may also get rapidly infected from contaminated trucks and/or at lairage, as these environments are commonly highly contaminated with *Salmonella* spp. (Hurd et al., 2001a; Swanenburg et al., 2001; Dorr et al., 2009). Newly infected pigs will usually shed *Salmonella* in few hours, and thus, the time spent during transport and at lairage is a potential factor that may favour shedding at slaughter (Berends et al., 1996; Hurd et al., 2001b; Beloeil et al., 2004).

The presence of *Salmonella* shedders at slaughter is therefore an obvious source of *Salmonella* contamination for the slaughter line regardless of further finding of contaminated carcasses. The probability of a pig shedding *Salmonella* at slaughter seems to be highly influenced by its previous *Salmonella* status. Thus, the main objective of this study was to assess that probability considering different on-farm pig *Salmonella* statuses.

Materials and Methods

Animal selection

The pigs belonged to a small fattening unit located in the NE of Spain, one of the largest pig-producing regions in Europe. The farm consistently showed a moderate-to-high prevalence of *Salmonella* spp. infection (>20%) and had been selected to carry out a series of field trials to assess the efficacy of some feed additives for its control (Andrés-Barranco et al., 2015). All the selected pigs included in this study were control pigs (i.e. those fed with the regular diet without the feed additive) from six different field trials carried out between June 2009 and September 2015 (≈ 50 pigs/trial).

Sample collection and laboratory methods

Pigs from each field trial were distributed among four pens (12–14 pigs/pen), individually ear tagged and monitored monthly during the fattening period for the presence of specific antibodies against *Salmonella*. Thus, blood samples had been collected a total of four times, that is after one, two and three months in the fattening unit and one last blood sample taken one to 3 days before slaughter. Sera were analysed with the HerdCheck[®] Swine *Salmonella* ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA).

At each blood sampling, on-farm faecal (OFEC) samples were also collected from pigs that began defecating upon personnel entry (≈ 5 pigs/pen). Faeces were collected before reaching the floor.

At slaughter, a minimum of 25 g of mesenteric lymph nodes (MLN) and faecal (SFEC) samples was collected from each pig for isolation of *Salmonella* spp. Bacteriology was performed according to the EN ISO 6579:2002/A1:2007 (Anonymous, 2007). A representative colony of *Salmonella* spp. from positive MLN and FEC samples was further serotyped at the National Reference Laboratory for Animal Salmonellosis (Madrid, Spain) following the White–Kauffmann–Le Minor scheme (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis (Ribot et al., 2006) was performed to assess the genetic relatedness of *Salmonella* serotypes isolated from both SFEC samples and MLN from the same pig. *Salmonella* cells were immobilized in agarose plugs (Lonza, Rockland, ME, USA) and then lysed at 54° C during 1.5–2 h with gentle agitation using sarcosyl (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and proteinase K (Ambion Inc., Austin, TX, USA). After washing the plugs, genomic DNA was digested with 10 U of the restriction enzyme XbaI (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). DNA fragments were resolved in agarose 1% w/v gels. Pulsed-field gel electrophoresis was carried out on a CHEF-DR III system (Bio-Rad, Hercules, CA,

USA). The running conditions were 6 V/cm at 14° C in 0.5× Tris–borate–EDTA buffer for 17 h with pulse times ramped from 2.2 to 63.8 s. *Salmonella* Braenderup H9812 (Culture Collection, University of Göteborg, Sweden) was used as molecular size marker. After electrophoresis, the gel was stained with GelRed. Gel images were captured on a GeneFlash (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK), converted into a tiff file and analysed with BioNumerics software (version 6; Applied Maths, Austin, TX, USA) using the Dice coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA dendrogram type) with a position tolerance of 1.5% and optimization of 2.0%.

A total of 296 pigs were initially identified within these six control cohorts, but only 202 presented all the samples and were finally included in this study. Pigs were excluded due to the lack of either SFEC samples because of missing ear tags or logistic problems (77), or any of the on-farm blood samples (17).

Statistical analyses

In a first step, the relationship between mean OD% values during the fattening period and sampling time (within-subject factor), bacteriology on MLN and on SFEC (between-subject factors) and the corresponding interactions among factors was assessed by general linear models repeated-measures analysis of variance. Further, pigs were classified into four groups according to serology and MLN colonization. Given the low specificity of the ELISA tests when low cut-off values were used (Vico et al., 2010), and as suggested in previous studies (Nollet et al., 2005; Merle et al., 2011; Methner et al., 2011), a cut-off value of OD% ≥ 40 was considered as the threshold to deem a pig as positive. Thus, group A consisted of pigs always seronegative during the whole fattening period and also negative for bacteriology in MLN at slaughter ($n = 69$); group B included pigs always seronegative during the fattening period but positive for bacteriology in MLN at slaughter ($n = 36$); in group C were all pigs that resulted seropositive in at least one of the blood samplings and positive for bacteriology in MLN ($n = 50$); and group D included pigs seropositive in at least one of the blood samplings but negative for bacteriology in MLN ($n = 47$). The description of the groups is summarized in Table 1.

Simple comparisons of the proportion of shedders between groups were assessed by chi-squared analyses. The overall relationship between these four groups and *Salmonella* shedding at slaughter was assessed by random-effects logistic regression, where the outcome variable was the presence/absence of *Salmonella* spp. in faeces (shedding), and the explanatory variable was the group (A, B, C and D). As pigs belonged to six different field trials (1–6) and were clustered into pens within each trial, the trial was

Table 1. Classification of the four groups (A, B, C and D) according to serological and bacteriological results and results from bacteriological sampling at farm

Group	No.	No. of possible positive serological samples	<i>Salmonella</i> in MLN*	No. of pig sampled at farm (at least once) (%)	No. of pig with positive faecal samples at farm (%)
A	69	0	–	54 (78.3)	0
B	36	0	+	31 (86.1)	1 (3.2)
C	50	1 to 4	+	39 (78)	23 (59)
D	47	1 to 4	–	40 (85.1)	16 (40)

* Mesenteric lymph nodes (MLN).

included in the model as a potential confounding factor and the pen as a random factor. All statistical analyses were performed using STATA software (STATA, StataCorp, L.P., USA). Significance was set at P -values ≤ 0.05.

Results

The repeated-measures ANOVA analysis showed a significant effect of sampling time ($P < 0.01$), bacteriology on SFEC samples ($P < 0.01$) and the interaction between sampling time and bacteriology on SFEC ($P < 0.01$) and sampling time and bacteriology on MLN samples ($P = 0.02$) on OD % values. Thus, after the first blood sampling, the mean OD% value rose significantly in both groups; however, for SFEC-positive pigs, the mean OD% values remained always above 40. Overall, SFEC-positive pigs showed significantly higher OD% values for the 2nd, 3rd and 4th blood samplings than SFEC-negative pigs (Fig. 1).

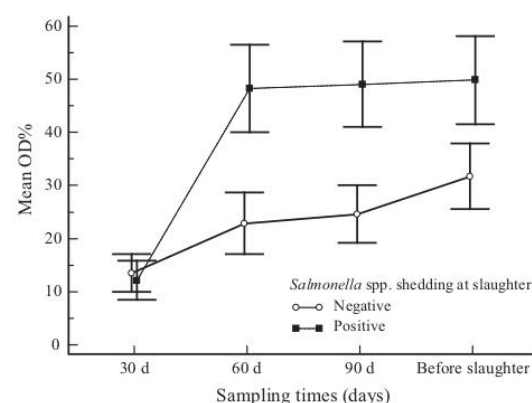


Fig. 1. Mean optical density percentage (OD%) values during the fattening period for pigs with *Salmonella*-positive and *Salmonella*-negative faecal samples at slaughter.

The proportion of shedders at slaughter in group A was high and close to that in group D (26.1% and 29.8%, respectively; $P = 0.66$), but significantly lower than the proportion of shedders for groups B and C (63.9% and 84%, respectively; $P < 0.01$). On-farm faecal samples were collected at least once during the fattening period from 54 pigs from group A, 31 from group B, 39 from group C and 40 from group D. No *Salmonella* spp. were isolated from OFEC samples in group A, and only one pig (3.2%) was found positive at farm in group B. However, for groups C and D, 23 (59%) and 16 (40%) pigs, respectively, shed *Salmonella* while at farm (Table 1).

The results from the random effect logistic regression indicated that the odds of shedding *Salmonella* at slaughter for groups B and C was 4.8 (95% CI = 1.5–15.5) and 20.9 (3.7–118) times higher, respectively, when compared to

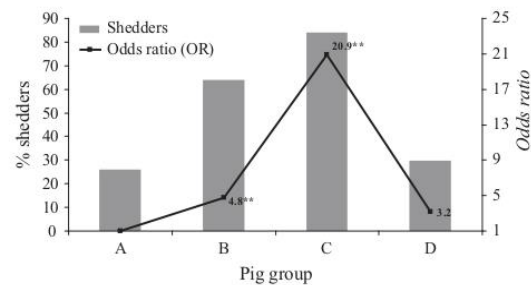


Fig. 2. Relationship between *Salmonella* shedding at slaughter and on-farm *Salmonella* status. Group A: pigs always seronegative during the fattening period and also negative for bacteriology in mesenteric lymph nodes (MLN) ($n = 69$); group B: pigs always seronegative during the fattening period but positive for bacteriology in MLN ($n = 36$); group C: pigs seropositive in at least one of the blood samplings and positive for bacteriology in MLN ($n = 50$); group D: pigs seropositive in at least one of the blood samplings but negative for bacteriology in MLN ($n = 47$). Group A: reference category to estimate the Odds Ratio. ** $P < 0.01$.

group A ($P < 0.01$). Figure 2 shows the proportion of pigs shedding *Salmonella* spp. at slaughter in each of the four groups (A, B, C and D) and their corresponding odd ratios when compared to group A.

Overall, the odds of shedding *Salmonella* spp. at slaughter was 4.9 (95% CI = 2–12.3; $P < 0.01$) times higher for MLN-positive pigs than for pigs for which *Salmonella* spp. could not be isolated from MLN. When this comparison was repeated only for pigs from groups with seropositive results (i.e. groups C and D), the odds of shedding *Salmonella* spp. at slaughter were even higher for MLN-positive pigs (OR=10.3; 95% CI = 2.3–44.8; $P < 0.01$).

Serotyping was available for 104 (68.9%) of the 151 *Salmonella* isolates obtained at slaughter from groups B and C (i.e. SFEC and MLN samples). The most frequent serotype in group B was S. 4,[5],12:i:-, while in group C was S. Rissen (Table 2). *Salmonella* isolates from paired SFEC and MLN samples were serotyped for 14 pigs from group B and 36 from group C. A total of 9 (64.2%) *Salmonella*-infected pigs from group B and 28 (77.7%) from group C showed the same serotype in MLN and SFEC samples. Pulsed-field gel electrophoresis analyses confirmed that 100% of the *Salmonella* isolates from SFEC samples in group B were genetically similar (>90% homology) to those from MLN (Fig. 3). This percentage was 96.4% for group C (Fig. 4).

Discussion

This study took advantage of secondary data on *Salmonella* serology and prevalence collected from pigs from one fattening unit which had been monitored in different field trials as control animals. Thus, these pigs would reflect somewhat the natural dynamics of the *Salmonella* pig infection in that fattening unit. The analysis of these data allowed detecting a significant relationship between on-farm serology and positive bacteriology on SFEC samples.

Table 2. Number and distribution of *Salmonella* serotypes in groups B and C according to type of sample

Serotype	Group B		Group C		Total <i>n</i> (%)
	SFEC <i>n</i> (%)	MLN <i>n</i> (%)	SFEC <i>n</i> (%)	MLN <i>n</i> (%)	
Typhimurium	2 (8.7)	1 (2.7)	17 (40.5)	13 (26)	33 (21.9)
4,[5], 12:i:-	8 (34.9)	14 (38.9)	3 (7.1)	7 (14)	32 (21.2)
Rissen	3 (13)	2 (5.7)	16 (38.1)	16 (32)	37 (24.4)
Derby	1 (4.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.7)
Thompson	0 (0)	1 (2.7)	0 (0)	0 (0)	1 (0.7)
No serotyped	9 (39.1)	18 (50)	6 (14.3)	14 (28)	47 (31.1)
Total	23 (100)	36 (100)	42 (100)	50 (100)	151 (100)

SFEC, slaughter faecal samples; MLN, mesenteric lymph nodes samples.

Group B: pigs always seronegative during the fattening period but positive for bacteriology in MLN ($n = 36$). Group C: pigs seropositive in at least one of the blood samplings and positive for bacteriology in MLN ($n = 50$).

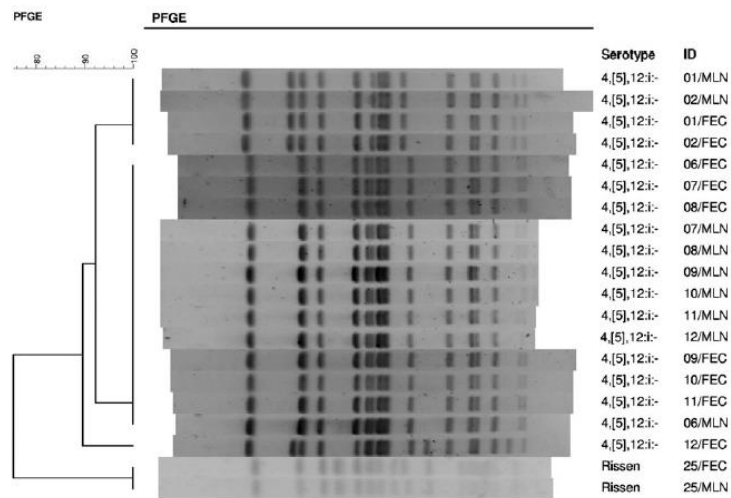


Fig. 3. Dendrogram showing the genetic relatedness between *Salmonella* isolates from faecal (FEC) and mesenteric lymph nodes (MLN) samples from infected pigs from group B.

Although both, the SFEC-positive and SFEC-negative groups, experienced a similar serological pattern, with a sharp increase of mean OD% values at the second sampling (60 days on fattening), SFEC-positive pigs always showed much higher mean OD% values from the 2nd to the last sampling than SFEC-negative pigs (Fig. 1). Thus, the use of a high cut-off value may help for discriminating potential shedding from non-shedding pigs. Time of sampling also appeared to be influencing the OD% values, which would correspond with the progression and maintenance of the infection in the fattening unit. The SFEC-positive pigs sero-converted much earlier and showed much higher OD% values than SFEC-negative pigs, suggesting that on-farm infection plays an important role in the shedding at slaughter.

To further study the reasons why pigs shed *Salmonella* at slaughter, pigs were grouped into four groups based on serology and bacteriology on MLN. A large proportion (26.1%) of pigs within group A, which could be considered as *Salmonella* non-infected pigs, ended up shedding *Salmonella* at slaughter. However, this unexpected high percentage of shedders in this group should not be considered the consequence of pig misclassification. The sensitivity of the EN ISO 6579:2002/A1:2007 on MLN, as performed in our laboratory, is quite high ($\approx 87\%$; Mainar-Jaime et al., 2013) and, although some false-negative serological results could be expected, the repeated observation of negative serological results along the fattening period suggested that the pigs remained uninfected. In addition, all the OFEC samples collected from these pigs were *Salmonella* negative. All these results clearly indicated that the chance of misclassification should be considered negligible.

The shedding of *Salmonella* in this group could be either the consequence of the exposure of non-infected pigs to *Salmonella*-contaminated environments during transport or lairage, and the likely transient passage of the ingested *salmonellae* through the intestine (Gradassi et al., 2015), or a very recent *Salmonella* infection that has not reached the MLN. The invasion of gut-associated lymph nodes (i.e. MLN) seems to be a function of the dose of exposure and *Salmonella* ability to invade deeper tissues (i.e. more invasive *Salmonella* strains) (Kranker et al., 2003; Osterberg et al., 2009; Methner et al., 2011). The area where this work was carried out is characterized by a high farm prevalence of *Salmonella* infection (Vico et al., 2011), and truck and lairage contamination was expected as strict hygiene and disinfection measures were not usually taken (authors' observations).

Pigs exposed to *Salmonella*-contaminated environments can get infected in few hours (Berends et al., 1996; Hurd et al., 2001b; Boughton et al., 2007), although the development of specific antibodies (IgG) may not be observed until after 7–14 days post-infection (Nielsen et al., 1995; van Winsen et al., 2001). Thus, serologically negative pigs that were MLN-positive (i.e. group B) should be considered as recently infected pigs, either at farm (approximately within the last 2 weeks of fattening) or during transport and/or lairage. Only one pig within this group (3.2%) was found shedding *Salmonella* spp. at farm, supporting this conclusion.

Recently infected pigs may become *Salmonella* shedders quickly after infection and for a median of 14 days (Pires et al., 2013), after which they usually turn into a stage of intermittent shedding (Nielsen et al., 1995; Kranker et al., 2003; Scherer et al., 2008). Thus, as

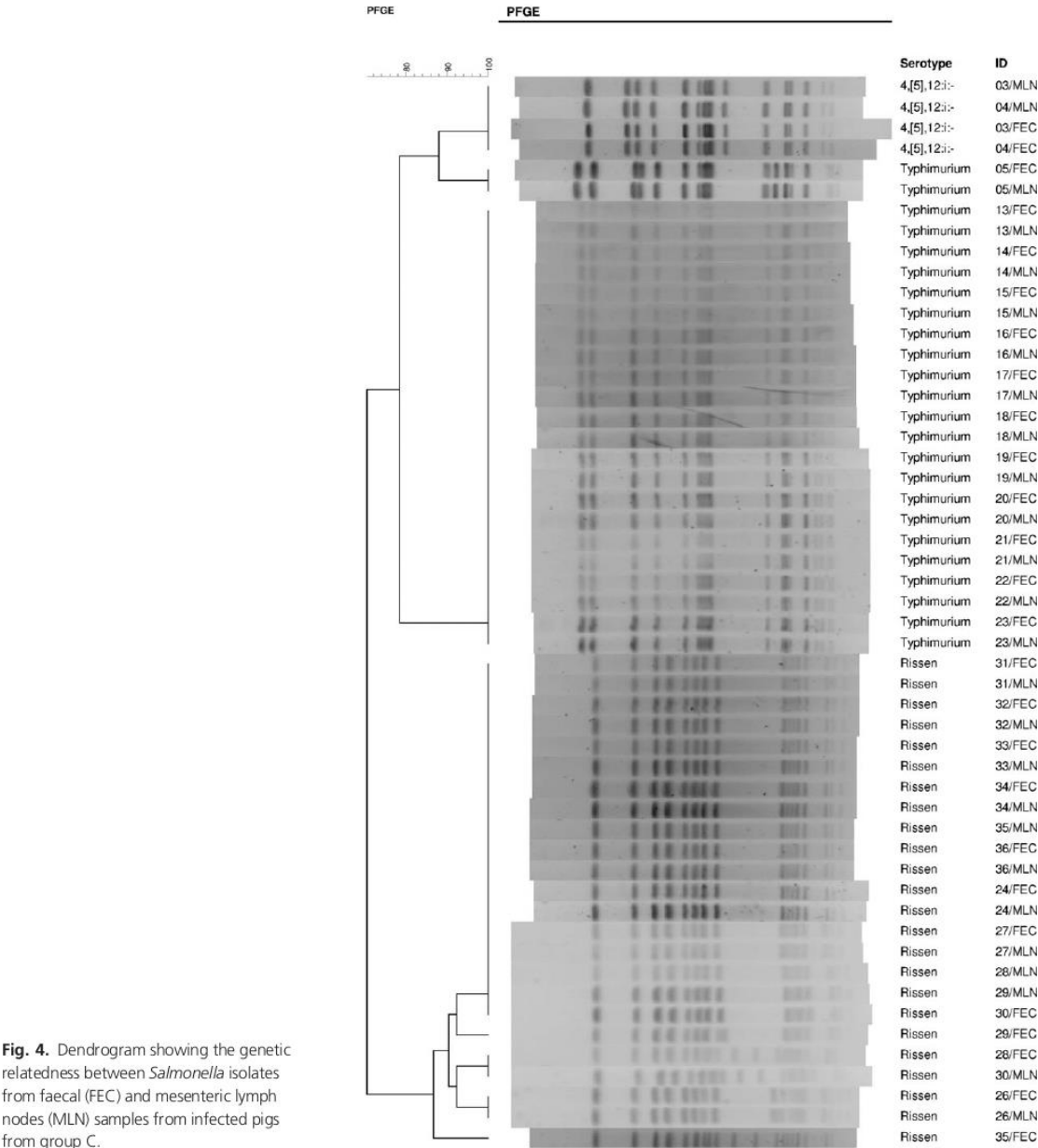


Fig. 4. Dendrogram showing the genetic relatedness between *Salmonella* isolates from faecal (FEC) and mesenteric lymph nodes (MLN) samples from infected pigs from group C.

expected, the proportion of shedders in group B was significantly higher (63.9%) than that for group A. In 14 pigs from group B, MLN- and SFEC-positive samples were serotyped and PFGE analysed, and most of them (64%) shed the same *Salmonella* strain that was detected in their MLN (Fig. 3), supporting the occurrence of new infections. Pigs within this group that showed different

serotypes in MLN and SFEC samples (36%) may have actually suffered simultaneous infections by different *Salmonella* strains, as previously reported in pigs (Garrido et al., 2014).

The proportion of shedders at slaughter in group B was significantly lower than that in group C (84%). Pigs from group C showed positive serology during the fattening

period and many of them (59%) had shed *Salmonella* at least once while at farm; therefore, these pigs were most likely infected in the farm (probably at least 2 weeks before slaughter). As indicated by their positive bacteriology on MLN, all these pigs remained infected up to slaughter. The higher proportion of shedders in this group may be the result of the recrudescence of previous on-farm infections (as suggested by the repeated-measures analysis), along with new infections occurring during the transport and/or lairage. Indeed, multiple infections by different *Salmonella* strains were also common in this group, as 25% of the pigs showed different serotype or PFGE pattern in MLN and SFEC samples (Table 2, Fig. 4).

Pigs within group D had been seropositive at least once during the fattening period, although most of them (55.3%) were seropositive twice or more times (results not shown). A large proportion (40%) of the sampled pigs within this group shed *Salmonella* while at farm, but in none of these pigs, *Salmonella* could be isolated from MLN, despite the fact that bacteriological analysis was performed twice on MLN samples to increase culture sensitivity. Serologically positive pigs that are bacteriologically negative in MLN have been reported elsewhere (Kranker et al., 2003; Methner et al., 2011; Gradassi et al., 2015). Self-cure has been suggested for some authors as a possible explanation for this situation (Kranker et al., 2003), while others simply assume that this health status is biologically possible because pigs can have an antibody response even when not infected (Gradassi et al., 2015). In this study, the majority of the pigs within this group showed very high OD% values (i.e. >50) for the last three blood samplings, which would suggest the presence of an active immune response, therefore self-cure seemed unlikely.

It has been reported that when 42-day-old pigs are experimentally infected with *S. Typhimurium*, infection can persist until market age, but the pathogen is recovered mostly from tonsils and ileum (Scherer et al., 2008). It appears that gut-associated lymphoid tissue would be less sensitive for the detection of *Salmonella*-infected pigs than other type of samples such as caecal content (Nielsen et al., 1995; Boughton et al., 2007). It is therefore possible that pigs within group D were actually infected, but MLN was not the most appropriate sample to assess *Salmonella* infection status. In fact, *Salmonella* would be isolated from ileo-caecal lymph nodes only in a moderate proportion (between 25% and 38%) of infected pigs (Scherer et al., 2008; Methner et al., 2011).

The proportion of shedders at slaughter for group D (29.8%) was significantly lower than for groups B and C, but close to that in group A, likely emphasizing the importance of the presence of *Salmonella* in MLN to trigger the shedding at slaughter. The odds of shedding *Salmonella*

spp. were always much higher for MLN-positive pigs, highlighting the importance that stress factors may have in particular on those pigs in which *Salmonella* had already colonized the MLN.

In conclusion, interpreting the relationship between the on-farm *Salmonella* status of a pig and its likelihood of shedding the bacterium at slaughter is complex, as *Salmonella* shedding seemed to depend on several factors such as seroconversion, cut-off value used, truck and lairage contamination, and bacteriological results on MLN. Pigs showing consistent seronegative results during the fattening period may end up shedding *Salmonella* at slaughter if they are exposed to highly contaminated environments. Thus, shorten periods of transport and lairage and good hygiene of truck and holding pens may help to prevent shedding. Regarding seropositive pigs reaching the slaughter, their likelihood of shedding *Salmonella* is much higher, but it may depend upon where the infection is located. These results suggest that when *Salmonella* has colonized the MLN, the probability of shedding at slaughter is significantly greater.

Acknowledgements

We thank AGROPIENSO SCL and the farmer for their collaboration to carry out all the field work, and Alberto Cebollada for helping with the PFGE data analysis. Funding was obtained from the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology -INIA- (ref. no. RTA2012-24) and the Government of Aragón (ref. DRU no. 2012-02-22-541-00-IFO-00770020052). ACH is the recipient of a national fellowship (ref. no. INIA-FPI 2014).

References

- Andrés-Barranco, S., J. P. Vico, V. Garrido, S. Samper, S. Herrera-León, C. de Frutos, and R. C. Mainar-Jaime, 2014a: Role of wild bird and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 689–697.
- Andrés-Barranco, S., J. P. Vico, M. J. Grilló, and R. C. Mainar-Jaime, 2015: Reduction of subclinical *Salmonella* infection in fattening pigs after dietary supplementation with a B-galactomannan oligosaccharide. *J. Appl. Microbiol.* 118, 284–294.
- Anonymous, 2007: ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples from the primary production stage. International Organization for Standardization. Available at: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=42109 (accessed 17 February 2016).

- Argüello, H., A. Alvarez-Ordóñez, A. Carvajal, P. Rubio, and M. Prieto, 2013: Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *J. Food Prot.* 76, 899–911.
- Beloeil, P. A., C. Chauvin, K. Proux, F. Madec, P. Fravalo, and A. Alioum, 2004: Impact of the *Salmonella* status of market-age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter. *Vet. Res.* 35, 513–530.
- Berends, B. R., H. A. Urlings, J. M. Snijders, and F. Van Knapen, 1996: Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *J. Food Microbiol.* 30, 37–53.
- Berends, B. R., F. Van Knapen, J. M. Snijders, and D. A. Mossel, 1997: Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 199–206.
- Blaha, T., 2010: Cost and Efficacy of Cleaning and Disinfection on Farms. Proceedings of the Meeting on Economic parameters relevant to Salmonella control in live pigs. Nov. 30, RVC, London, UK.
- Boughton, C., J. Egan, G. Kelly, B. Markey, and N. Leonard, 2007: Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathog. Dis.* 4, 33–40.
- Dorr, P. M., D. A. Tadesse, B. M. Zewde, P. Fry, S. Thakur, and W. A. Gebreyes, 2009: Longitudinal study of *Salmonella* dispersion and the role of environmental contamination in commercial swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1478–1486.
- EFSA and ECDC, 2015: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13, 4329.
- Fosse, J., H. Seegers, and C. Magras, 2009: Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. *Zoonoses Public Health* 56, 429–454.
- Garrido, V., S. Sanchez, B. San Roman, A. Zabalza-Barangua, Y. Diaz-Tendero, C. de Frutos, R. C. Mainar-Jaime, and M. J. Grilló, 2014: Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs. *BMC Vet. Res.* 10, 59.
- Gotter, V., T. Blaha, and G. Klein, 2012: A case-control study on the occurrence of *Salmonella* spp. in the environment of pigs. *Epidemiol. Infect.* 140, 150–156.
- Gradassi, M., A. Caminiti, G. Galletti, A. Santi, G. Paternoster, M. Tamba, M. Zanoni, S. Tagliabue, G. L. Alborali, and M. Trevisani, 2015: Suitability of a *Salmonella* control programme based on serology in slaughter heavy pigs. *Res. Vet. Sci.* 101, 154–160.
- Hurd, H. S., J. K. Gailey, J. D. McKean, and M. H. Rostagno, 2001a: Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* typhimurium-contaminated environment. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1194–1197.
- Hurd, H. S., J. D. McKean, I. V. Wesley, and L. A. Karriker, 2001b: The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *J. Food Prot.* 64, 939–944.
- Hurd, H. S., J. D. McKean, R. W. Griffith, I. V. Wesley, and M. H. Rostagno, 2002: *Salmonella* enterica infections in market swine with and without transport and holding. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2376–2381.
- Issenhuth-Jeanjean, S., P. Roggentin, M. Mikoleit, M. Guibourdenche, E. de Pinna, S. Nair, P. I. Fields, and F. X. Weill, 2014: Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 165, 526–530.
- de Knecht, L. V., S. M. Pires, and T. Hald, 2015: Attributing food-borne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. *Epidemiol. Infect.* 143, 1175–1186.
- Kranner, S., L. Alban, J. Boes, and J. Dahl, 2003: Longitudinal study of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2282–2288.
- Mainar-Jaime, R. C., S. Andrés, J. P. Vico, B. San Román, V. Garrido, and M. J. Grilló, 2013: Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 standard method for detection of *Salmonella* spp. on mesenteric lymph nodes from slaughter pigs. *J. Clin. Microbiol.* 51, 89–94.
- Merle, R., S. Kusters, T. May, U. Portscht, T. Blaha, and L. Kreienbrock, 2011: Serological *Salmonella* monitoring in German pig herds: results of the years 2003-2008. *Prev. Vet. Med.* 99, 229–233.
- Methner, U., N. Rammner, K. Fehlhaber, and U. Rösler, 2011: *Salmonella* status of pigs at slaughter-bacteriological and serological analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 15–20.
- Nielsen, B., D. Baggesen, F. Bager, J. Haugegaard, and P. Lind, 1995: The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examination. *Vet. Microbiol.* 47, 205–218.
- Nollet, N., D. Maes, L. Duchateau, V. Hautekiet, K. Houf, J. Van Hoof, L. De Zuttera, A. De Kruif, and R. Geers, 2005: Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet. Res.* 36, 545–555.
- Osterberg, J., S. S. Lewerin, and P. Wallgren, 2009: Patterns of excretion and antibody responses of pigs inoculated with *Salmonella* Derby and *Salmonella* Cubana. *Vet. Rec.* 165, 404–408.
- Pires, S. M., deKnecht L., and T. Hald, 2011: Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Scientific/Technical report submitted to EFSA. National Food Institute, Technical University of Denmark. Available at: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_out-put/files/main_documents/184e.pdf (accessed 21 January 2016).
- Pires, A. F., J. A. Funk, and C. A. Bolin, 2013: Longitudinal study of *Salmonella* shedding in naturally infected finishing pigs. *Epidemiol. Infect.* 141, 1928–1936.
- Ribot, E. M., M. A. Fair, R. Gautom, D. N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan, and T. J. Barrett, 2006: Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping

- of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59–67.
- Rostagno, M. H., H. S. Hurd, J. D. McKean, C. J. Ziemer, J. K. Gailey, and R. C. Leite, 2003: Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4489–4494.
- Scherer, K., I. Szabó, U. Rösler, B. Appel, A. Hensel, and K. Nöckler, 2008: Time course of infection with *Salmonella* typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *J. Food Prot.* 71, 699–705.
- Swanenburg, M., H. A. Urlings, D. A. Keuzenkamp, and J. M. Snijders, 2001: *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. *J. Food Prot.* 64, 12–16.
- Vico, J. P., B. Engel, W. G. Buist, and R. C. Mainar-Jaime, 2010: Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. *Zoonoses and Public Health* 57, 107–114.
- Vico, J. P., I. Rol, V. Garrido, B. San Román, M. J. Grilló, and R. C. Mainar-Jaime, 2011: Salmonellosis in finishing pigs in Spain: prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. *J. Food Prot.* 74, 1070–1078.
- van Winsen, R. L., A. van Nes, D. Keuzenkamp, H. A. Urlings, L. J. Lipman, S. Biesterveld, J. M. Snijders, J. H. Verheijden, and F. van Knapen, 2001: Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. *Vet. Microbiol.* 80, 267–274.

PUBLICACIÓN II / PUBLICATION II

Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis

Mainar-Jaime, R.C., Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S.

Zoonoses and Public Health 2018, 65(1):e222-e228

Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis

R. C. Mainar-Jaime¹ | A. Casanova-Higes² | S. Andrés-Barranco² | J. P. Vico³

¹Dpt. de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón -IA2- (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain

²Unidad de Producción y Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2- (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, Spain

³IRNASUS-CONICET-Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina

Correspondence

Raúl C. Mainar-Jaime, Dpt. de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón -IA2- (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain.
E-mail: rcmainar@unizar.es

Funding information

National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA), Grant/Award Number: INIA-FPI 2014 and RTA2012-24; Government of Aragón, Grant/Award Number: DRU no. 2012-02-22-541-00-IFO-00770020052

Summary

Most swine *Salmonella* national control programmes in Europe have been based on the categorization of herds according to risk levels based on serological results. However, none of the non-Scandinavian countries have reported of any significant success on *Salmonella* infection reduction in fattening pigs or the number of human cases attributable to pigs or pork. The limited accuracy of the tests used, the small number of animals sampled and the likely lack of herd representativeness of the samples used could be major factors affecting the suitability of these programmes. Focusing on minimizing *Salmonella* shedding at slaughter appears more important to prevent human infections than focusing on detection of seropositive pigs/herds at this stage. This study assessed whether performing on-farm serology may help to predict shedding at slaughter. Between 2010 and 2016, pigs from six cohorts from a *Salmonella*-positive herd were bled at 30, 60 and 90 days on fattening and before slaughter, and faecal samples collected at slaughter. Serology on days 60, 90 and before slaughter predicted somewhat shedding at slaughter with no significant differences among them. Pigs with higher OD% values at these point times would have higher risk of shedding when arriving to slaughter. The probability of shedding for a pig sampled on day 90 and showing an OD% value of 10 was 43%, and the risk increased up to 65% if the OD% was 40. Concluding, on-farm serology may help to determine to some extent the risk of *Salmonella* shedding at slaughter from seropositive fattening units, which would allow for prompt on-farm and slaughter interventions to reduce the likelihood of slaughter contamination with *Salmonella*.

KEYWORDS

control programmes, *Salmonella*, serology, swine

1 | INTRODUCTION

In the mid-1950s, Sweden experienced severe *Salmonella* outbreaks, and contaminated animal products were associated with these outbreaks (Lundbeck, Plazikowski, & Silverstolpe, 1955). This prompted the beginning of the first comprehensive *Salmonella* National Control Program in Europe (Wierup, 2006). The objective of the Swedish *Salmonella* control programme was to deliver animal products for human consumption free from *Salmonella*, and it was based on

preventing *Salmonella* contamination of the whole production chain. Pigs were for first time considered as a potential source of human salmonellosis. Recently, the contribution of pigs to human salmonellosis in the EU has been quantified, and it is now considered as its second major source (de Knecht, Pires, & Hald, 2015; Pires, Knecht, & Hald, 2011).

After the Swedish control programme, other Scandinavian countries followed suit with Denmark, one of the major European pig-exporting countries, starting its own programme in 1995 (Mousing et al.,

1997). The success of the Scandinavian programmes along with new European regulations (Regulation -EC- No 2160/2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents) triggered the implementation of national control programmes in other European countries (Germany and United Kingdom in 2002, Ireland in 2003, the Netherlands in 2005 and Belgium in 2007; Anonymous, 2008; Blaha, 2003; Hanssen, Swanenburg, & Maassen, 2007; Méroc et al., 2012). In general, these programmes were mostly based on the Danish model, with the use of serology as the cornerstone of all them. In brief, a small number of pigs are sampled annually, usually at slaughter (blood or meat juice), and pig farms are characterized within different risk categories (I, II, and III) based on some sort of estimation of a weighted seroprevalence (levels of infection may vary widely among batches and years), with those farms with higher seroprevalence (i.e. category III) being considered the "highest-risk" herds. Farmers from these farms are encouraged to initiate herd-specific activities aimed at reducing their risk level, that is, at decreasing the exposure to *Salmonella*, so they can reduce seroprevalence and move to lower categories.

Although some positive achievements have been reached after the implementations of these programmes, to the authors' knowledge, none of the non-Scandinavian countries has reported of any overall significant success on *Salmonella* infection reduction in fattening pigs or on the number of human cases attributable to pigs or pork. On the contrary, United Kingdom suspended its meat juice testing for *Salmonella* antibodies in 2012 and moved towards an "on-farm risk assessment" approach based on a scoring system (Anonymous, 2012). Belgium discontinued its serological programme in 2015 but kept advisory veterinarians on the field (Brossé, 2015). Germany, although still keeps the original programme based on serology and herd categorization, has not detected a significant reduction in category III farms (Blaha, 2017).

There are many country-specific factors that may be responsible for the lack of success of these programmes, but a major and common contributor to all of them may have relied on serological tests of limited diagnostic accuracy. Several studies have shown the lack of correlation between serological and microbiological results for detection of pig salmonellosis at the individual level (Farzan, Friendship, & Dewey, 2007; Funk, Harris, & Davies, 2005; Methner, Rammler, Fehlhaber, & Rösler, 2011; Nollet et al., 2005; Vico, Engel, Buist, & Mainar-Jaime, 2010). The variability associated with the use of different ELISAs or matrices (serum or meat juice) has been also reported (Farzan et al., 2007; Mainar-Jaime, Atashparvar, Chirino-Trejo, & Blasco, 2008; Mejía, Casal, Mateu, & Martín, 2005; Vico & Mainar-Jaime, 2011). Thus, the bias assumed when these ELISAs are used on individuals should be translated to the herd level as well, which probably make them unsuitable for proper herd risk characterization (Gradassi et al., 2015; Sørensen, Alban, Nielsen, & Dahl, 2004; Vico et al., 2010). The small sample size usually considered (between 36 and 100 pigs/year) for an infection whose presentation varies among batches and years, and the lack of representativeness of the on-farm animal distribution, as pigs are usually sampled at slaughter, are factors that also may have contributed to increase that bias. The wrong *Salmonella* characterization of a pig herd certainly leads to a misperception of its actual *Salmonella* risk. In addition,

Impacts

- Most swine *Salmonella* national control programmes in Europe have failed to report any significant success on *Salmonella* infection reduction in fattening pigs or the number of human cases attributable to pigs or pork.
- On-farm serology may help to predict to some extent the probability of a pig shedding *Salmonella* at slaughter.
- The use of on-farm serology would allow for prompt on-farm and slaughter interventions to reduce the likelihood of slaughter contamination with *Salmonella*.

the lack of good, reliable and cost-effective on-farm interventions may also explain in part the lack of success of these programmes, as the efficacy of the different interventions seems to be very variable (FAO-WHO, 2015). Thus, a new approach may be needed to tackle this problem, and, if serology has to be used, then, it seems reasonable to look for a different role for it.

The sources of carcass contamination are multiple, and global approaches considering the whole food chain (i.e. from stable to table) are required (Alban & Stärk, 2005), but the presence of *Salmonella* in the pig's faeces is with no doubt a major source of slaughter and carcass contamination (Argüello, Álvarez-Ordoñez, Carvajal, Rubio, & Prieto, 2013; Swart, Simons, Evers, Snary, & Swanenburg, 2015). Thus, for the pig farms, one of the most important objectives to address should be the reduction in the proportion of pigs shedding *Salmonella* that arrive to the slaughterhouse. Indeed, a reduction in *Salmonella* loads in the guts of slaughtered pigs might help to reduce the proportion of contaminated carcasses in the slaughter (Pesciaroli et al., 2017). The slaughter plants should, in turn, maintain strict hygienic measures (i.e. improving singeing procedures, reducing probability of cross-contamination at degutting and handling), as these measures are likely the best way to reduce the number of contaminated carcasses (Alban & Stärk, 2005). Therefore, focusing on the prevention of *Salmonella* shedding when pigs arrive to the slaughterhouse may be an initial step far more important than focusing on detection of seropositivity at this stage.

It has been observed that pigs shedding *Salmonella* at slaughter seroconverted earlier during the fattening period than non-shedders pigs (Casanova-Higes, Andrés-Barranco, & Mainar-Jaime, 2017a), which may help to predict the risk of shedding at slaughter. Thus, in this study, we assess whether performing on-farm serology may help to predict shedding at slaughter and, if so, when, during the fattening period, serology would predict it better.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Animal selection and sample collection

This study takes advantage of results from six field trials carried out between 2010 and 2016 in a small fattening unit ($N \approx 110$) to

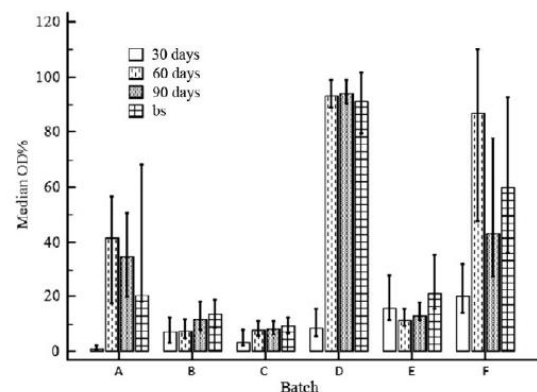
TABLE 1 Proportion of slaughter pigs shedding *Salmonella* and infected with *Salmonella* (presence of the bacterium in mesenteric lymph nodes.-MLN-) for each batch of pigs analysed

	Batch (no. of pigs)					
	A (25)	B (28)	C (49)	D (48)	E (41)	F (42)
% of shedders at slaughter (95%CI)	60 (39.4, 80.6)	21.4 (5.2, 37.6)	69.4 (66, 82.8)	75 (62.3, 87.7)	9.7 (0.3, 19.2)	14.3 (3.2, 25.3)
% of carrier pigs in MLN at slaughter (95%CI)	76 (58, 94)	18.5 (2.8, 34.2)	40.8 (26.5, 55.1)	68.7 (55.1, 82.3)	7.3 (0, 15.3)	40.5 (25.5, 55.9)

assess the efficacy of the addition to the pig feed of different products for the control of *Salmonella* infection. The pigs considered for the study belonged to six control groups (i.e. groups on which no interventions were carried out) included in those field trials (hereinafter batches A to E). Each batch of control pigs included ≈50 pigs. The farm was located in the NE of Spain and was known to be *Salmonella* positive.

Pigs had been individually identified by ear tags, and only those that had been blood sampled at 30 (30d), 60 (60d) and 90 (90d) days in the fattening unit and within 3 days before slaughter (approximately 1 month from last sampling), and for which a minimum of 25 g of faecal (FEC) samples were collected at slaughter, were considered for this study. In addition, 25 g of mesenteric lymph nodes (MLN) was also collected at slaughter from these pigs to determine their infection status.

Serum was obtained after blood clotting and kept at -20°C until analysed. The HerdCheck Swine *Salmonella* ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) was used for detection of antibodies against *Salmonella* spp., and results expressed as OD% values following manufacturer's instructions. Bacteriology on FEC and MLN samples was performed according to the EN ISO 6579:2002/A1:2007 (Anonymous, 2007).

**FIGURE 1** ELISA median OD% values and their corresponding 95% confidence intervals for pig serum samples collected on day 30 (30d), 60 (60d) and 90 (90d) on fattening and before slaughter (bs) for six batches of pigs (A–F)

2.2 | Statistical analysis

Median OD% values and their corresponding 95% confidence intervals were estimated for each sampling time and for each batch of pigs. Overall estimates of prevalence of shedding (FEC +) and infection (MLN +) at slaughter were also calculated for each batch.

The relationship between OD% values (log-transformed) at each sampling time (30d, 60d, 90d and before slaughter) and shedding at slaughter was assessed by logistic regression analysis after adjusting by batch. When a significant association was found, Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were constructed, and the area under the curve (AUC) estimated. Estimates of probability of shedding *Salmonella* were calculated from the logistic regression equations. The relationship between being a MLN-positive pig and shedding at slaughter was also assessed by logistic regression analysis. All statistical analyses were performed with STATA software (STATA, StataCorp, LP, USA).

3 | RESULTS

3.1 | Overall estimates

Of a total of 306 pigs, 233 (76.1%) met the inclusion criteria and were included in the study. For 55 of them, no information was available on shedding at slaughter, and 18 lacked some serological data. The number of sampled pigs varied among batches, with a minimum of 25 (52%) pigs for batch A and a maximum of 49 (96%) for batch C (Table 1). Overall, a total of 101 (43.3%; 95%CI: 36.9, 49.8) pigs were shedding *Salmonella* spp. at slaughter, and in 97 (41.8%; 95%CI: 35.4, 48.2), *Salmonella* spp. was isolated from MLN. Results on prevalence of shedding and infection by batch are shown in Table 1. An overall positive significant relationship between being a MLN-positive pig and shedding *Salmonella* at slaughter was also found (OR = 4.2; CI95%: 2.02–8.57; $p < .001$).

Serological results differed among batches. The OD% values for pigs from the batches B and C remained quite low (medians around or below 10%) for all sampling times. In contrast, for batches A, D and F, OD% values increased significantly after first sampling on day 30 (Figure 1). For batch E, OD% values remained similar along the fattening period with some increase in the last sampling.

No relationship was observed between OD% values and shedding at slaughter when serum samples were collected on day 30 on

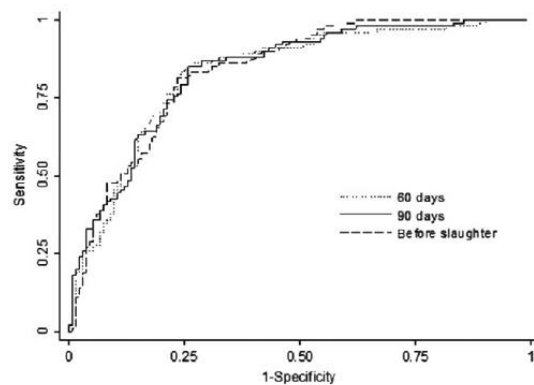


FIGURE 2 Receiver Operating Characteristic (ROC) curves estimated for prediction of shedding when an ELISA test was used on serum samples collected at 60 and 90 days on fattening and before slaughter

fattening ($p = .79$). However, a positive significant relationship was found between OD% values and shedding at slaughter for samplings on days 60, 90 and before slaughter (p values of .009, .004 and .004, respectively). Thus, the use of the ELISA at day 30 on fattening was not considered for further analysis.

3.2 | ROC analysis and estimates of probability of *Salmonella* shedding

Figure 2 depicts the ROC curves for the ELISA test with regard to shedding at slaughter when performed at 60 and 90 days on fattening and before slaughter. Table 2 shows the AUCs for these ROC analyses. No differences were observed regarding AUC among these three sampling times.

As batches B and C presented very low OD% values along the entire fattening phase, a further ROC analysis was performed only with those batches that showed some increase in OD% values along this period (A, D, E and F). Results remained similar although the AUC for the different sampling times increased somewhat (Table 2).

Estimates of the probability of shedding *Salmonella* spp. at slaughter with regard to OD% values for pigs sampled on day 90 of the fattening period from batch A are shown in Figure 3. When all batches were considered the probability of shedding *Salmonella* spp. for a pig showing an OD% = 10 was as high as 42.8%. When only batches that showed some increase in OD% values during the fattening period were included (batches A, D, E and F), this probability was slightly lower (39.7%; Figure 3).

4 | DISCUSSION

Pig salmonellosis is increasingly related to human salmonellosis (Snary, Swart, & Hald, 2016) being probably the most important zoonotic infection of pigs now. The main aim of any swine *Salmonella* control

TABLE 2 Area under the curve (AUC) from the ROC analyses assessing the accuracy of ELISA test results for predicting shedding at slaughter when serum was collected at three different sampling times along the fattening period

Day of serum sampling	All batches		Only batches A, D, E and F	
	AUC	95%CI (AUC)	AUC	95%CI (AUC)
60 days on fattening	0.829	0.77, 0.88	0.844	0.78, 0.91
90 days on fattening	0.835	0.78, 0.89	0.860	0.80, 0.92
Before slaughter	0.835	0.78, 0.89	0.876	0.82, 0.93

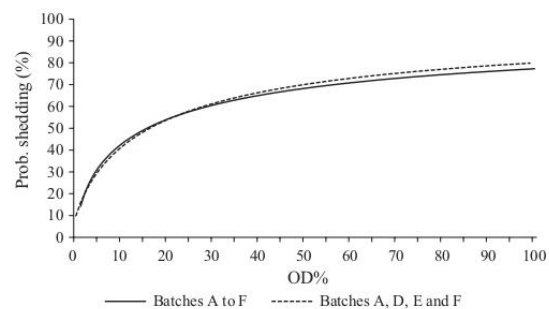


FIGURE 3 Estimated probability of shedding at slaughter for a pig with regard to the OD% value on serum when pigs from batch A were blood sampled on day 90 of the fattening period. Estimates are calculated for all the batches together (A–F) and only for those batches that showed increasing OD% values along the fattening period (A, D, E and F)

plan should then be to contribute to the reduction in the incidence of human salmonellosis. Had on-farm serology be useful for predicting *Salmonella* shedding at slaughter, then it may help to reduce the risk of abattoir contamination and the subsequent carcass contamination, which is the most likely source of contamination of pork and pork products.

Pig salmonellosis is an infection highly variable because depends on the concurrence of a large variety of factors related to the pig, the farm, the environment, the slaughter, etc., which may vary within and among years (Fosse, Seegers, & Magras, 2009). For that reason, in the current approach, national control programmes usually rely on a weighted mean seroprevalence to characterize pig farms after several consecutive samplings (Anonymous, 2008; Blaha, 2003; Hanssen et al., 2007; Méroc et al., 2012; Mousing et al., 1997). In this study, carried out along six almost consecutive years on a fattening unit known to be *Salmonella* positive and from an area of high prevalence of *Salmonella* in pigs (Vico et al., 2011), results among batches differed largely, representing this expected variability somehow. Serological results showed different on-farm pig *Salmonella* exposure experiences among batches. In batches B and C, the low OD% values

observed suggested that *Salmonella* hardly circulated within the unit. Interestingly, the proportion of pigs shedding *Salmonella* at slaughter was relatively high or very high (21.4% in B and 69.4% in C), and the prevalence of infection also followed the same pattern (18.5% and 40.8%, respectively). It appears that pigs in batch B, and particularly in batch C, would have been infected at the end of the fattening period, i.e. within the last 10–15 days before slaughter, or during transport or lairage, with no time to develop detectable antibodies (IgG) (Nielsen, Baggesen, Bager, Haugegaard, & Lind, 1995; van Winsen et al., 2001). This would explain why pigs remained seronegative but many were MLN-positive and also shed *Salmonella* at slaughter. As pigs usually shed *Salmonella* right after the initial infection and for some days and then become intermittent shedders (Beloeil et al., 2003; Nielsen et al., 1995; Scherer et al., 2008), the use of on-farm serology at any time point during the fattening period would have been virtually useless in these two batches.

In contrast, pigs from batches A, D and F experienced a significant increase in OD% values after the first sampling on day 30, which was compatible with the circulation of *Salmonella* on the farm and pigs being exposed to the bacterium. In all these batches, the proportion of both infected and shedding pigs was high (Table 1). In this scenario, shedding at slaughter would have been associated not only to early on-farm infections likely exacerbated by the stress induced by the transport to the slaughterhouse and the lairage (Argüello et al., 2013), but also to some new infections occurring close to the date of slaughter. All together would explain the overall positive highly significant association observed between infected pigs (i.e. MLN-positive) and *Salmonella* shedding at slaughter (OR = 4.2; CI95%: 2.02–8.57; $p < .001$). Pigs from batch E kept OD% values relatively low and fairly constant along the fattening period, which was consistent with moderate levels of infection and shedding at slaughter (7.3% and 9.7%, respectively). In this latter situation, few new cases of infection seemed to have occurred during transport or lairage.

To explore the potential that on-farm serology may have to predict *Salmonella* shedding at slaughter considering this variability in scenarios, this study considered all the batches in a first step. Logistic regression and ROC analyses were used for assessing the relationship between on-farm serological results obtained from pigs at different time points during the fattening period and shedding at slaughter. A variable number of pigs were analysed within each batch due to the different availability of complete serological and microbiological information from the pigs in each batch, i.e. from a minimum of 52% of the pigs with complete information in batch A to a maximum of 96% in batch C. The number of pigs included in each batch and the lack of association between the inclusion criteria and the pig serological status (data not shown) suggested that the sample used was representative of the whole batch.

Serological results at the beginning of the fattening period, i.e. on day 30 of fattening, appeared to be useless for the objective of predicting shedding at slaughter. This was an expected result as many pigs at 30d may not have getting in contact with *Salmonella* yet, and some seropositive pigs at this time may have become seronegative before arriving to the slaughter (van der Wolf et al., 2001). Thus, sampling

pigs on day 30 of fattening seems to be too early in order to get a proper picture of what the shedding status of the batch would be at slaughter. However, and despite serological and microbiological results from batches B and C, an overall significant positive correlation was observed between serology when serum samples were collected at 60, 90 days on fattening or just before slaughter and *Salmonella* shedding at slaughter.

Analysing pig serum in any of the last three sampling times yielded similar results as indicated by their corresponding AUC. Pigs with higher OD% values at these point times would have higher risk of shedding when arriving to slaughter (Figure 3). When all batches were considered in the analysis, the probability of shedding *Salmonella* at slaughter for a pig from batch A, sampled on day 90, and presenting an ELISA OD% value of 10 was around 43%. This risk increased significantly up to 65% if the pig had an OD% of 40. When the analysis was carried out only with the batches that experienced an increase in OD% values after the first sampling (i.e. excluding batches B and C), the risk of shedding tended to be slightly lower for low OD% values (39.7% for an OD% = 10) and remained similar for OD% values of 40 (Figure 3). These latter estimates appeared to be somewhat more realistic as those batches of pigs that were likely infected close to the date of slaughter were not included. As for these pigs serology is not able to predict *Salmonella* shedding at slaughter, then it is reasonable to expect that the analysis with all the batches will yield biased results towards increasing the risk of shedding for pig showing low OD% values. Had infection during transport and lairage be prevented, the ability of on-farm serology to predict shedding at slaughter would have surely improved.

Bearing in mind the limitations of this study, which was restricted to a single farm sampled in different years, its results should be taken with caution. Overall, they suggest that for infections occurring time ahead of the slaughter date (between 15 and 45 days before), on-farm serology may be of help to determine to some extent the risk of *Salmonella* shedding at slaughter. To achieve this objective, a representative sample of pigs should be selected from the batch of interest. Once the potential risk of shedding has been determined for a batch, on-farm interventions could then be scheduled ahead of time to try to mitigate the probability of shedding when pigs arrive to slaughter. For example, the addition of organic acids to the feed, water or both may help to reduce *Salmonella* shedding (Calveyra et al., 2012; Creus, Pérez, Peralta, Baucells, & Mateu, 2007; Lynch et al., 2017), but this strategy will surely require long periods of treatment, at least 4 weeks, before any positive effect is detected (Casanova-Higes, Andrés-Barranco, & Mainar-Jaime, 2017b). Thus, on-farm serum sampling could be performed any time after 60 days on fattening and until 2–3 days before slaughter, but as sooner the serum is collected and analysed, more time will be available to implement this type of strategy and higher the likelihood of obtaining some positive effects. In addition, being the slaughter aware of the risk, additional interventions could be implemented such as special transport, separate lairage and logistic slaughter. A combined farm/slaughterhouse approach would likely have cumulative benefits (Swart et al., 2016). This approach would also benefit

from a more precise serological characterization of the pig farms as proper representative serum samples of the pigs in the batch will be collected. Farms presenting low OD% values on day 90 would be expected to remain so for the rest of the fattening period if nothing wrong happens during the time remaining before slaughter. But as pigs showing consistent seronegative results during the fattening period may end up shedding *Salmonella* at slaughter if they are exposed to highly contaminated environments (Casanova-Higes et al., 2017a), appropriate disinfection of trucks and lairage areas should be guaranteed for these pigs to try to prevent late infections and further shedding. A large-scale study to confirm the potential of this approach to reduce *Salmonella* shedding at slaughter is warranted.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology -INIA- (ref. no. RTA2012-24) and the Government of Aragón (ref. no. DRU no. 2012-02-22-541-00-IFO-0 0770020052). ACH is the recipient of a national fellowship (ref. no. INIA-FPI 2014). We thank AGROPIENSO SCL and the farmer for their collaboration to carry out all the fieldwork.

CONFLICT OF INTEREST

None.

ORCID

Raúl C. Mainar-Jaime  <http://orcid.org/0000-0001-5442-7702>

REFERENCES

- Alban, L., & Stärk, K. D. (2005). Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? *Preventive Veterinary Medicine*, 68, 63–79. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.001>
- Anonymous (2007). ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples from the primary production stage. *International Organization for Standardization*. Retrieved from http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=42109
- Anonymous (2008). Control plan for *Salmonella* in pigmeat. *Food Standards Agency*, INT 08/09/01. Retrieved from <http://tna.europarchive.org/20130814101929/http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/board/int080901.pdf>
- Anonymous (2012). UK: New direction for Zoonoses National Control Programme (ZNCP). *Pig Progress*. Retrieved from <http://www.pigprogress.net/Health-Diseases/Health/2012/6/UK-New-direction-for-Zoonoses-National-Control-Programme-ZNCP-PP008961W/>
- Argüello, H., Álvarez-Ordoñez, A., Carvajal, A., Rubio, P., & Prieto, M. (2013). Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *Journal of Food Protection*, 76, 899–911. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-404>
- Beloil, P. A., Chauvin, C., Proux, K., Rose, N., Queguiner, S., Eveno, E., ... Madec, F. (2003). Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Preventive Veterinary Medicine*, 60, 207–226. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00126-0)
- Blaha, T. (2003). Implementing a *Salmonella* monitoring programme for Pork in Germany. *Proceedings from Safepork '03: 5th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork*, 1–4 October, Crete, Greece, pp. 200–202.
- Blaha, T. (2017). The German *Salmonella* serological monitoring programme. Retrieved from <https://www.3tres3.com/salmonela/el-programa-aleman-de-monitorizacion-serologica-de-salmonella-37930/> (accessed on 31 May 2017).
- Brossé, C. (2015). *Salmonella* in pigs Belgium. 2nd International *Salmonella* Symposium IDT Biologika – 12 Years of Directive 2003/99/EC: How far have we really come? 23–25 May, Wörlitz, Germany.
- Calveyra, J. C., Nogueira, M. G., Kich, J. D., Biesus, L. L., Vizzotto, R., Berno, L., ... Cardoso, M. (2012). Effect of organic acids and mannanoligosaccharide on excretion of *Salmonella* typhimurium in experimentally infected growing pigs. *Research in Veterinary Science*, 93, 46–47. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.08.018>
- Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., & Mainar-Jaime, R. C. (2017a). Influence of on-farm pig *Salmonella* status on *Salmonella* shedding at slaughter. *Zoonoses and Public Health*, 64, 328–336. <https://doi.org/10.1111/zph.12301>
- Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., & Mainar-Jaime, R. C. (2017b). Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 231, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.06.008>
- Creus, E., Pérez, J. F., Peralta, B., Baucells, F., & Mateu, E. (2007). Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. *Zoonoses and Public Health*, 54, 314–319. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01069.x>
- de Knecht, L. V., Pires, S. M., & Hald, T. (2015). Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. *Epidemiology & Infection*, 143, 1175–1186. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001903>
- FAO-WHO (2015). Interventions for the control of nontyphoidal *Salmonella* spp. in beef and pork. Report of a joint FAO/WHO expert meeting. 28 September – 2 October. 257 p.
- Farzan, A., Friendship, R. M., & Dewey, C. E. (2007). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd. *Epidemiology & Infection*, 135, 238–244. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006868>
- Fosse, J., Seegers, H., & Magras, C. (2009). Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: A review. *Zoonoses and Public Health*, 56, 429–454. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01185.x>
- Funk, J. A., Harris, I. T., & Davies, P. R. (2005). Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* prevalence in growing swine. *Veterinary Microbiology*, 107, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.006>
- Gradassi, M., Caminiti, A., Galletti, G., Santi, A., Patemoster, G., Tamba, M., ... Trevisani, M. (2015). Suitability of a *Salmonella* control programme based on serology in slaughter heavy pigs. *Research in Veterinary Science*, 101, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.015>
- Hanssen, E. J., Swanenburg, M., & Maassen, C. B. M. (2007). The Dutch *Salmonella* monitoring programme for pigs and some recommendations for control plans in the future. *Proceedings from Safepork '07: 7th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork*. Verona, Italy, pp. 169–172.
- Lundbeck, H., Plazikowski, U., & Silverstolpe, L. (1955). The Swedish *Salmonella* outbreak of 1953. *Journal of Applied Microbiology*, 18, 535–548.
- Lynch, H., Leonard, F. C., Walla, K., Lawlor, P. G., Duffy, G., Fanning, S., ... Argüello, H. (2017). Investigation of in-feed organic acids as a

- low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 139, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.02.008>
- Mainar-Jaime, R. C., Atashparvar, N., Chirino-Trejo, M., & Blasco, J. M. (2008). Accuracy of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Salmonella* spp. in slaughter pigs from Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 85, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.12.015>
- Mejía, W., Casal, J., Mateu, E., & Martín, M. (2005). Comparison of two commercial ELISAs for the serological diagnosis of salmonellosis in pigs. *The Veterinary Record*, 157, 47–48. <https://doi.org/10.1136/vr.157.2.47>
- Méroc, E., Strubbe, M., Vangroenweghe, F., Czaplicki, G., Vermeersch, K., Hooyberghs, J., & van der Stede, Y. (2012). Evaluation of the *Salmonella* surveillance program in Belgian pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 105, 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.03.006>
- Methner, U., Rammner, N., Fehlhaber, K., & Rösler, U. (2011). *Salmonella* status of pigs at slaughter—Bacteriological and serological analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.028>
- Mousing, J., Jensen, P. T., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B., ... Bech-Nielsen, S. (1997). Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 29, 247–261. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(96\)01082-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(96)01082-3)
- Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J., & Lind, P. (1995). The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examination. *Veterinary Microbiology*, 47, 205–218. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00113-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00113-1)
- Nollet, N., Maes, D., Duchateau, L., Hautekiet, V., Houf, K., Van Hoof, J., ... Geers, R. (2005). Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Veterinary Research*, 36, 545–555. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005014>
- Pesciaroli, M., Cucco, L., De Luca, S., Massacci, F. R., Maresca, C., Medici, L., ... Magistrali, C. F. (2017). Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.021>
- Pires, S. M., deKnecht, L., & Hald, T. (2011, August 25). Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Scientific/Technical report submitted to EFSA. National Food Institute, Technical University of Denmark. Retrieved from http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/184e.pdf
- Scherer, K., Szabo, I., Rosler, U., Appel, B., Hensel, A., & Nockler, K. (2008). Time course of infection with *Salmonella* typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *Journal of Food Protection*, 71, 699–705. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.4.699>
- Snary, E. L., Swart, A. N., & Hald, T. (2016). Quantitative microbiological risk assessment and source attribution for *Salmonella*: Taking it further. *Risk Analysis*, 36, 433–436. <https://doi.org/10.1111/risa.12605>
- Sørensen, L. L., Alban, L., Nielsen, B., & Dahl, J. (2004). The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. *Veterinary Microbiology*, 101, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.016>
- Swart, A., Simons, R., Evers, E., Snary, E., & Swanenburg, M. (2016). Modeling of *Salmonella* contamination in the pig slaughterhouse. *Risk Analysis*, 36, 498–515.
- van der Wolf, P. J., Lo Fo Wong, D. M., Wolbers, W. B., Elbers, A. R., van der Heijden, H. M., van Schie, F. W., ... Tielen, M. J. (2001). A longitudinal study of *Salmonella enterica* infections in high- and low-seroprevalence finishing swine herds in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, 23, 116–121. <https://doi.org/10.1080/01652176.2001.9695096>
- van Winsen, R. L., van Nes, A., Keuzenkamp, D., Urlings, H. A., Lipman, L. J., Biesterveld, S., ... van Knapen, F. (2001). Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. *Veterinary Microbiology*, 80, 267–274. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00313-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00313-3)
- Vico, J. P., Engel, B., Buist, W. G., & Mainar-Jaime, R. C. (2010). Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. *Zoonoses and Public Health*, 57, 107–114. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01364.x>
- Vico, J. P., & Mainar-Jaime, R. C. (2011). The use of meat juice or blood serum for the diagnosis of *Salmonella* infection in pigs and its possible implications on *Salmonella* control programs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 528–531. <https://doi.org/10.1177/1040638711403432>
- Vico, J. P., Rol, I., Garrido, V., San Román, B., Grilló, M. J., & Mainar-Jaime, R. C. (2011). Salmonellosis in finishing pigs in Spain: Prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. *Journal of Food Protection*, 74, 1070–1078. <https://doi.org/10.4315/0362-028XJFP-10-515>
- Wierup, M. (2006, March 13–17). The Swedish *Salmonella* control in primary production – an overview of its background, strategy and development: *Salmonella Workshop – control in poultry from feed to farm*. National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden, pp. 11–14.

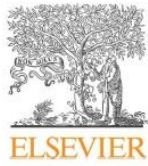
How to cite this article: Mainar-Jaime RC, Casanova-Higes A, Andrés-Barranco S, Vico JP. Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis. *Zoonoses Public Health*. 2018;65:e222–e228. <https://doi.org/10.1111/zph.12432>

PUBLICACIÓN III / PUBLICATION III

Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigs

Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C.

Animal Feed Science and Technology 2017, 231:12-18



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Feed Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anifeedsci

Original Research Paper

Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigsAlejandro Casanova-Higes^a, Sara Andrés-Barranco^a, Raúl C. Mainar-Jaime^{b,*}^a Unidad de Producción y Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2– (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, Spain^b Dpt. de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón –IA2– (Universidad de Zaragoza-CITA), Avda. Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Feed
Organic acids
Salmonellosis
Sodium butyrate
Swine

ABSTRACT

Organic acids (OA) are seen as an alternative to antibiotics to reduce the burden of enteropathogens. Two replicates of a field trial were carried out to assess the effect of the addition of protected sodium butyrate (PSB) to the feed (dose of 3 kg/T) along the fattening period on the dynamics of *Salmonella* spp. infection in pigs. In each trial, around 50 pigs were assigned to a treatment group (TG) and 50 kept as controls (CG). Pigs were serologically monitored monthly and on-farm fecal samples and fecal and mesenteric lymph nodes (MLN) samples at slaughter were collected. In the first replicate, pigs became probably infected with *Salmonella* before the addition of PSB to the feed, but despite of that an overall lower proportion of shedders along the end of fattening period and lower seroprevalence before slaughter (50% vs. 89.6%; $P < 0.001$) was observed in the TG. In the second replicate, few pigs shed *Salmonella* during the trial, which precluded the finding of significant differences between groups for both *Salmonella* infection and shedding, but the seroprevalence at slaughter in the CG was again significantly higher than in the TG (31.1% vs. 13.7%, respectively; $P = 0.02$) and it was related to a higher proportion of shedders and MLN-positive pigs. When results from both trials were analyzed together, a significant increasing risk of shedding in the CG was observed at 90 days of fattening and at slaughter, and an overall significant decreasing trend in OD% values and thus in seroprevalence was also observed when pigs approached to slaughter. In conclusion, the dietary administration of this PSB during the whole fattening period was able to reduce significantly the seroprevalence in the TG, which may reflect a positive effect on the control of *Salmonella* at the end of the fattening period.

1. Introduction

Human salmonellosis is considered the second most important foodborne infection in the European Union (EFSA and ECDC, 2016), and pigs and products thereof are considered one of the most important sources of infection for humans (De Knecht et al., 2015). In the pig industry, salmonellosis and other bacterial enteric diseases have been traditionally prevented with the use of antimicrobials, which may have favored the selection for antimicrobial resistance (AR) (Davies and Davies, 2010).

Drug-resistance in non-typhoidal *Salmonella* is climbing and it is now considered a matter of concern (CDC, 2013). As examples, high resistance to aminoglycosides, antimicrobials critically important for human medicine, was first discovered in Spain in 2005 in

* Corresponding author.

E-mail address: rcmainar@unizar.es (R.C. Mainar-Jaime).<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.06.008>Received 8 May 2017; Received in revised form 13 June 2017; Accepted 14 June 2017
0377-8401/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

an *E. coli* isolate of pig origin (Gonzalez-Zorn et al., 2005) and further detected in *Salmonella* isolates (Folster et al., 2009). Likewise, new plasmid-mediated resistance to colistin, a last-resource antibiotic for Gram-negative human infections, was first found in the *Enterobacteriaceae* family in 2015 (Liu et al., 2016). Aminoglycosides and polymyxins have been commonly used in intensive pig husbandry systems for preventing enteric diseases (EMA, 2014; EMA, 2016).

The concerns about the emergence of AR have prompted European Health Authorities to reconsider their use for meat production, triggering new EU regulations on the use of antibiotics in veterinary medicine. Thus, the use of antibiotics as growth promoters was banned in 2006 (Regulation – EC- no. 1831/2003), and guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine, among which included avoiding their use as prophylactics, were published (Anon, 2015). In 2015 oral colistin was banned for its use as prophylactic and the period of administration was reduced to a maximum of 7 days (EMA, 2016).

The emergence of AR has reinforced the search for alternative products for the control of enteric infections in pigs. Organic acids (OA) or their salts might be beneficial for the productive performance of fattening pigs (Partanen and Mroz, 1999), but they are also known for their *in vitro* capacity to inhibit the growth and proliferation of Gram-negative pathogens. They would enter into the bacterial cell in their non-dissociated form and decrease the intracellular pH when dissociating, thus disrupting DNA synthesis. They also seem to favor commensal lactic bacteria by reducing extracellular pH and avoid the expression of some *Salmonella* invasion genes (Van Immerseel et al., 2005; Gantois et al., 2006). Therefore, OA are seen as an alternative to antibiotics to reduce the burden of enteropathogens *in vivo*.

Results on the effectiveness of OA for the control of pig salmonellosis are variable (van der Wolf et al., 2001a; Papenbrock et al., 2005; Creus et al., 2007; De Busser et al., 2009; Martín-Peláez et al., 2010; Calveyra et al., 2012; Walia et al., 2016), which is likely associated to different study designs (i.e. piglets vs. fattening pigs; natural vs. experimental infection; different administration periods, etc.) or the use of different acids, blends, or doses. A critical review of on-farm intervention strategies against *Salmonella* carried out in 2009 found that only in three (37.5%) out of the eight publications analyzed, a beneficial effect, either a reduction on fecal prevalence or seroprevalence, was detected when OA were used (Friendship et al., 2009). In addition, a systematic review on interventions for *Salmonella* reduction on grow-finish pigs found a significant heterogeneity in results when OA were used, precluding the presentation of a single summary estimate, which was likely due to the small number of studies available on grow-finish pigs (Wilhelm et al., 2012).

There is a clear need for more research on the use of OA for *Salmonella* reduction in fattening pigs to get a better idea of the effectiveness of the different types of OA available in the market. In particular, on new forms of OA (i.e. encapsulated or protected OA) that may act on the more distal part of the gastrointestinal tract (Piva et al., 2007). For this purpose, a field trial was carried out to assess the effect of the addition of protected sodium butyrate (PSB) to the feed on *Salmonella* infection dynamics in fattening pigs from an area of high *Salmonella* infection prevalence.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

Two replicates of a field trial were carried out in June 2014 and in August 2015 in a small (≈ 100 pigs/8 pens) commercial *Salmonella*-infected fattening unit located in NE of Spain. The two replicates were separated a minimum of one year to prevent carry-over effects from the first replicate to the second. Feed with the PSB was administered to animals from 4 randomly selected pens (treatment group – TG-) and the remaining 4 pens were fed with the same basal diet without PSB (control group – CG-). All the pens were within the same barn. The compound feed was provided in 40-kg bags and manually administered to the animals by the farmer, who was unaware of the treatment allocation. A single dose of 3 kg of PSB (GUSTOR BP70, Norel S.A., Madrid, Spain) per ton of feed was used. The treatment began 15 days after pigs entered into the fattening unit and after finishing the in-feed antibiotic treatment (10 weeks-old pigs) and was administered until slaughter (approximately 3.5 months later).

2.2. Sampling scheme

Serum samples from all pigs were collected after 30, 60 and 90 days on the fattening unit, and within the last week before slaughter, to check for the presence of antibodies against *Salmonella* spp. On-farm fecal (OF) samples (a minimum of 25 g of feces) were collected along with the blood from approximately 25 pigs per group. Since fecal material was collected only after spontaneous defecation to reduce the risk of environmental contamination of the sample, the final number of sampled pigs varied between 21 and 29 (Table 1), but at least 3 pigs from each pen were included in each sampling to make sure the sampling of all the pens. The TG and CG were transported to the slaughterhouse separately. At slaughter, fecal (SF) and mesenteric lymph nodes (MLN) samples were collected from all pigs after evisceration.

2.3. Laboratory analysis

Sera were kept at -20°C until serological analyses were carried out. The Herdcheck Swine *Salmonella* ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, US) was used for detection of antibodies (IgG) against *Salmonella* spp. Given the low specificity of the ELISA test (Vico et al., 2010), and as suggested in previous studies (Nollet et al., 2005), a cut-off value of OD% ≥ 40 was considered for seroprevalence estimates. *Salmonella* spp. isolation was performed on OF, SF and MLN samples following the standard ISO 6579:2002/Amd 1:2007 method.

Table 1

Microbiological results for *Salmonella* isolation for pig on-farm fecal samples (OF) after 30 (30d), 60 (60d), 90 (90d) days in the fattening unit and for mesenteric lymph nodes (MLN) and fecal samples at slaughter (SF) for the control (CG) and treatment (TG) groups in trials 1 and 2.

Replicate	Group	Fattening unit								Slaughter							
		OF at 30d				OF at 60d				OF at 90d				SF			
		No.	No. + (%)	P	No.	No. + (%)	P	No.	No. + (%)	P	No.	No. + (%)	P	No.	No. + (%)	P	No.
1	CG	29	19 (65.5)	0.07	21	5 (23.8)	0.2	21	7 (33.3)	0.02	48	36 (75)	0.06	48	33 (68.7)	0.06	
	TG	28	12 (42.8)		21	2 (9.5)		22	1 (4.5)		50	29 (58)		50	42 (84)		
2	CG	25	0 (0)	0.5	25	1 (4)	0.5	25	2 (8)	0.5	42	4 (9.3)	0.35	42	3 (7.1)	0.4	
	TG	25	0 (0)		25	0 (0)		25	1 (4)		48	3 (6.2)		48	2 (4.1)		
Both*	CG	54	19 (35.2)	0.07	46	6 (13)	0.12	46	9 (19.6)	0.02	90	40 (44.4)	0.05	90	36 (40)	0.14	
	TG	53	12 (22.6)		46	2 (4.3)		47	2 (4.2)		98	32 (32.6)		98	44 (44.9)		
	OR (95% OR)		NE			NE			5.6 (1.1–26.9)			2 (0.95–4.3)			NE		

*Mantel-Haenszel corrected; NE: not estimated; One-tailed *P*-value.

2.4. Statistical analyses

Fisher exact test was used to assess statistical differences between the CG and the TG regarding *Salmonella* seroprevalence (cut-off value $\geq 40\%$) and proportion of shedders at different time points, and infection prevalence (proportion of MLN-positive pigs) at slaughter in each trial individually. Wilcoxon test was used when comparing paired samples within a trial. Differences between the CG and the TG for both replicates together were estimated after adjusting by trial through the Mantel–Haenszel test for repeated tests of independence. A one-tailed *P*-value ≤ 0.05 was considered for significance as only positive effects of PSB were expected (i.e. a reduction of prevalence, seroprevalence or shedding). When differences were statistically significant the probability (measured as Odds Ratio – OR) of a pig shedding *Salmonella* or becoming *Salmonella* infected/seropositive for the CG compared to the TG was also calculated. In addition, logistic regression analysis was used to assess the overall relationship between being a seropositive pig (OD% ≥ 40) and shedding and infection at slaughter.

The effects of sampling time (within-subject factor), and treatment (between-subject factor), and the corresponding interactions among them, on OD% values during the fattening period were assessed by general linear models repeated measures analysis of variance (ANOVA) for each trial separately and further for both trials together. Log transformation of OD% values was carried out before analysis. All statistical analyses were performed using STATA software (STATA, StataCorp, L.P., USA).

3. Results

3.1. Trial 1

In the first replicate both groups showed a high proportion of pigs shedding *Salmonella* spp. two weeks after beginning of treatment (30 days on fattening), although in the TG it was already somewhat lower (42.8% vs. 65.5% in the CG; $P = 0.07$). This difference was also observed after 90 days (33.3 vs. 4.5, respectively; $P = 0.02$) and at slaughter (75% vs. 58%, respectively; $P = 0.06$). Interestingly, at slaughter some more infected pigs (MLN +) were found in the TG compared to the CG (84% vs. 68.7%, respectively; $P = 0.06$) (Table 1).

Table 2

Seroprevalence of *Salmonella*, estimated as the proportion of pigs showing OD% values ≥ 40 , after 30 (30d), 60 (60d), 90 (90d) days in the fattening unit and before slaughter, for the control (CG) and treatment (TG) groups in trials 1 and 2.

Replicates	Group	Fattening unit												Before slaughter			
		30d				60d				90d							
		No.	No. + (%)	P	No.	No. + (%)	P	No.	No. + (%)	P	No.	No. + (%)	P	No.	No. + (%)	P	No.
1	CG	50	9 (18)	0.5	50	48 (96)	0.08	48	44 (91.6)	0.41	48	43 (89.6)					
	TG	51	10 (19.6)		51	43 (84.3)		51	45 (88.2)		50	25 (50)					
2	CG	52	13 (25)	0.5	47	6 (12.7)	0.17	45	5 (11.1)	0.43	45	14 (31.1)	0.03				
	TG	52	14 (26.9)		50	11 (22)		50	4 (8)		51	7 (13.7)					
Both*	CG	102	22 (21.5)	0.44	97	54 (55.6)	0.46	93	49 (52.6)	0.30	93	57 (61.2)					
	TG	103	24 (23.3)		101	54 (53.4)		101	49 (48.5)		101	32 (31.6)					
	OR (95%OR)		NE			NE			NE			4.9 (2.4–10.1)					

*Mantel-Haenszel corrected; NE: not estimated; One-tailed *P*-value.

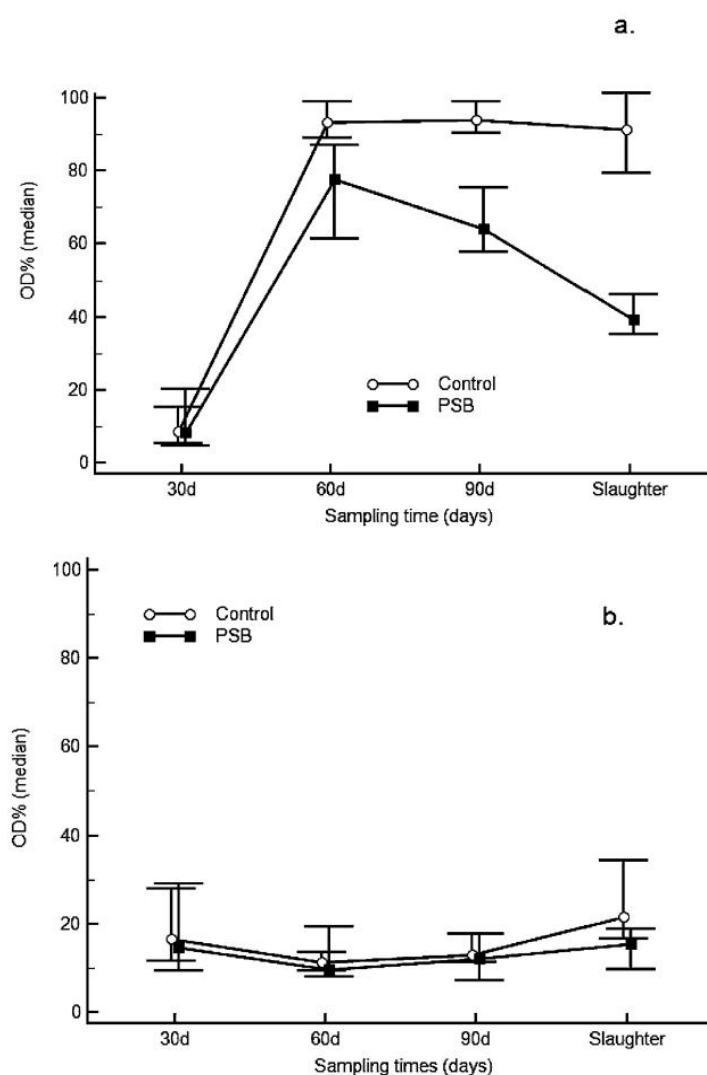


Fig. 1. Median optical density percentage (OD%) values and their corresponding 95% confidence intervals at the different sampling times for the control (Control) and treatment (PSB) groups for trials 1 (a.) and 2 (b.).

Regarding seroprevalence, it was significantly lower in the TG only before slaughter (89.6% in the CG vs. 50% in the TG; $P < 0.001$) (Table 2). A significant decrease in seroprevalence was observed in the TG between the third and fourth sampling (88.2 vs. 50%, respectively; $P < 0.001$) (Table 2). On the first sampling in this first trial, OD% values were low for both groups (median OD% = 9.2 in CG, and 7.4 in TG), but 30 days later they increased significantly (90.4 and 78.2, respectively). Although the median OD% values were high in the TG, they remained significantly lower than in the CG for the rest of the fattening period (Fig. 1a). The repeated measures ANOVA showed a significant effect of treatment and time on OD% values ($P < 0.01$). A clear decreasing trend of OD% values was observed in the TG as pigs approached slaughter. At slaughter, median OD% for the TG was significantly lower than that for the CG (39.2 vs. 91.3, respectively; $P < 0.001$) (Fig. 1a). Overall, the mortality rate recorded by the farmer in this replicate was within the normal range for this farm in both groups (2–3%).

3.2. Trial 2

In the second trial, very few pigs shed *Salmonella* along the fattening period and no significant differences were observed between groups along the trial (Table 1). Overall seroprevalence was much lower than in the first trial as well as the prevalence of infection at

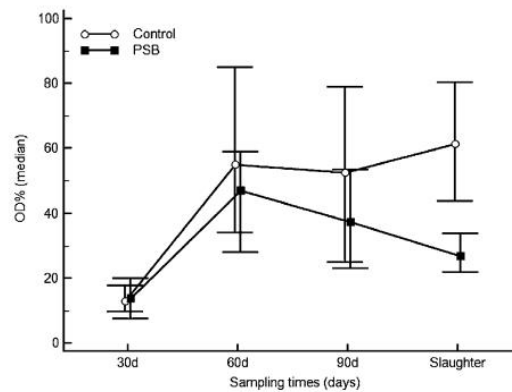


Fig. 2. Median optical density percentage (OD%) values and their corresponding 95% confidence intervals at the different sampling times for the control (Control) and treatment (PSB) groups when results from trial 1 and trial 2 were analyzed together.

slaughter. However, as in the first trial, seroprevalence before slaughter was significantly higher for the CG (31.1% vs. 13.7% in the TG; $P = 0.03$) (Table 2).

The median OD% value at slaughter for the CG was significantly higher than that at 30, 60 and 90 days on fattening ($P = 0.06$, $P < 0.001$, $P < 0.001$, respectively), but no differences in OD% values were observed across samplings in the TG. The repeated measures ANOVA did not find any significant effect of treatment on OD% values ($P = 0.34$), but the median OD% value at slaughter was significantly lower in the TG compared to the CG (15.6 vs. 21.5, respectively; $P < 0.001$) (Fig. 1b). Mortality in the CG was much higher than that in the TG. Seven (14%) pigs died in the CG during the fattening while only one (2%) was withdrawn from the TG ($P = 0.03$).

3.3. Overall results (Trials 1 and 2)

An overall significant reduction in the number of shedders was observed for the TG after 90 days after adjusting by the effect of the trial. The probability of shedding at this time was around 5.6 times higher for the CG compared to the TG (OR = 5.6, 95%CI: 1.1–26.9; $P = 0.04$). The difference remained somewhat at slaughter (OR = 2, 95%CI: 0.95–4.3; $P = 0.05$). No relationship was observed between treatment and *Salmonella* infection (Table 1).

An overall significant effect of treatment on seroprevalence was also observed for the sampling before slaughter. The probability of being a seropositive pig before slaughter was almost 5 times higher for the CG compared to the TG (OR = 4.9, 95%CI: 2.4–10.1; $P < 0.001$). When OD% values from both trials were analyzed together by repeated measures ANOVA after including replicate as another between-subject factor, a significant effect of treatment ($P < 0.01$), time of sampling ($P < 0.01$), trial ($P < 0.01$), and the interactions between treatment and time ($P < 0.05$) and time and trial ($P < 0.01$) on the OD% values was found. In general, after an initial and sharp upward trend from the first to the second sampling in both groups, a continuous decrease of the OD% values was observed in the TG, while they increased in the CG (Fig. 2).

No overall relationship was detected between being a seropositive pig and shedding (OR = 1.4, 95%CI: 0.65, 3.2; $P = 0.19$) or infection (OR = 0.47, 95%CI: 0.16, 1.36; $P = 0.09$) at slaughter. However, this relationship differed by trial. In the first trial no association was detected between seropositivity and shedding at slaughter ($P = 0.26$), but a negative significant one was observed between being seropositive and infection (OR = 0.16, 95%CI: 0.03–0.74; $P = 0.01$). On the contrary, in the second trial, a significant relationship was observed between seropositivity and shedding at slaughter (OR = 35, 95%CI: 3.9–321; $P < 0.01$), and between seropositivity and infection (OR = 7, 95%CI: 1.1–45.6; $P = 0.05$).

4. Discussion

To assess the effectiveness of OA for *Salmonella* reduction under field conditions is complex. There are many factors (i.e. *Salmonella* exposure and prevalent serotypes, palatability of the feed, diet buffering capacity, presence of concomitant infections, etc.) that may contribute to the variability of results (De Lange et al., 2010; Walia et al., 2016). In this study, two replicates of the same trial were carried out one year apart on the same fattening unit under the same management conditions but disparate results were found between trials. Differences were most likely due to different environmental conditions, i.e. levels of initial exposure to *Salmonella* spp., occurring in the fattening unit for each trial. In the first replicate, a large number of pigs became likely infected within the two weeks before starting the treatment with PSB, as suggested by the high proportion of shedders after 30 days on fattening and the low OD% values observed at that time for both groups. Thus, many pigs from the TG may have developed a carrier state that would not have been affected by the treatment. Although this initial situation supposed a true challenge for any product intended to reduce *Salmonella* infection, it was still possible to assess the impact that the use of the PSB may have on *Salmonella* shedding in pigs supposedly infected previously. In the second replicate, however, few pigs shed *Salmonella* spp. along the fattening period, which

precluded the finding of significant differences between the CG and TG for both *Salmonella* infection and shedding.

The dynamics of shedding in the first trial, as suggested by looking at results from the CG, showed a decrease in the number of shedders after the first sampling (days 60 and 90), which may be attributed to the lower level of stress of the infected pigs due to their adaptation to the farm environment (i.e. after the establishment of group hierarchies). The transport to the slaughter and the lairage period would have acted as stressor factors that would explain the reactivation of the shedding at slaughter along with possible new infections or re-infections at these stages (Hurd et al., 2002; Rostagno et al., 2003; Scherer et al., 2008) (Table 1). Although this pattern did not appear to be altered by the addition of the PSB in the TG, in general a lower number of shedders was detected along the trial for this group. A significant reduction ($P = 0.02$) in the number of shedders in the TG was observed after 90 days on fattening, and a close-to-significant ($P = 0.07$) reduction after 15 days on treatment (first sampling) and at slaughter ($P = 0.06$) (Table 1), suggesting some positive effect of PSB on the reduction of *Salmonella* shedders. The limited number of pigs considered in each group may have prevented to attain significant results.

Serological results in this trial supported previous findings. Median OD% values decreased significantly in the TG after 60 days on fattening, being this reduction particularly important after 90 days (Fig. 1a). The proportion of seropositive pigs during the fattening period that showed seronegative results at slaughter was significantly higher in the TG compared to the CG (Table 2). This important drop suggested a lower exposure to *Salmonella* spp. in the TG during the last period of fattening, which would be explained by either a reduction in the proportion of *Salmonella* shedders or in the amount of bacteria shed in the feces in this group. The lack of exposure to *Salmonella* spp. in the TG would have ceased stimulating the pig's immune system and thus antibody levels would tend to decline. The observation of seropositive growers pigs that become seronegative at slaughter has been already described (Dahl et al., 1997; van der Wolf et al., 2001b). However, this quick decrease in OD% values in a relatively short period of time (one month) was really unexpected. The authors are not aware of studies assessing the evolution of the pig immune response once *Salmonella* exposure ceases, and further research is warranted on this subject.

Despite the significantly higher number of *Salmonella*-infected pigs at slaughter in this trial, the lower number of shedding pigs and the decreasing trend in OD% values observed in the TG would suggest that the PSB had a positive effect on reducing the shedding in *Salmonella*-infected pigs.

Regarding the second trial, bacteriology on OF samples indicated a low level of pig infection during the fattening for both groups and no significant differences were found between them. However, the number of dead/withdrawn pigs in the CG was significantly larger than in the TG (14% vs. 2%, respectively). Although the causes of death/withdrawal were not recorded, it is likely that it had an impact on the proportion of shedders in this group, as weakened pigs would have been more prone to become infected by *Salmonella* and therefore shed the pathogen, thus increasing the odds of infecting other pigs within the group. *Salmonella* shedding has been previously associated with other concomitant enteric pathogens such as *Lawsonia intracellularis* that may affect the efficacy of PSB (Walia et al., 2016).

Serology in this trial would somewhat reflect the overall low prevalence of infection during most of the fattening period. Indeed, it showed an initial decrease in OD% values (Fig. 1b) for both groups from the first to the third sampling, likely associated with a lack of new infections. However, as expected for an infection that usually builds up as time passes when no specific control measures are taken, in the CG the median OD% value was significantly higher at slaughter compared to previous samplings. This pattern was not seen in the TG, likely due to the treatment with the PSB. The significant lower seroprevalence observed prior to slaughter in the TG would suggest the positive effect of PSB on reducing the likelihood of infection and shedding. Indeed, in this trial a significant positive relationship was observed between being a seropositive pig and shedding and infection at slaughter.

When analyzing both trials together an increased number of sampled pigs were considered in each group and, after adjusting by trial, a significant increasing risk of shedding in the CG was observed at 90 days on fattening and at slaughter. The magnitude of this increase was somewhat limited at slaughter (44.4% in the CT vs. 32.6% in the TG), which could likely be due to the large number of pigs that were already infected in the TG at the beginning of the first trial and that ended up shedding after being stressed. Regarding serology, an overall significant decreasing trend in OD% values (Fig. 2) and thus in seroprevalence was observed when pigs approached to slaughter, which may be associated with some prevention of *Salmonella* infection due to the likely lower exposure to the pathogen. This reduction in seroprevalence may also help to improve the herd risk category in the context of a national *Salmonella* control program based on serological results, such as those implemented in Denmark or Germany (Mousing et al., 1997; Merle et al., 2011).

These results are similar to those found in previous studies where OA were administered for at least 4 weeks (Creus et al., 2007; Argüello et al., 2013; De Ridder et al., 2013; Walia et al., 2016), which suggested that long periods of treatment are required before any positive effect is detected. The use of the PSB with the only purpose of reducing *Salmonella* seroprevalence may then be expensive for a commercial pig farm. However, OA might also improve pig performance, especially after exposure to enteric pathogens such as *Salmonella* (Gebru et al., 2010), which may help to reach a cost-benefit trade-off. Since no results on production data (weight gain, feed intake, etc.) were considered in this study, no proper cost-benefit analysis could be performed to assess the economic feasibility of using PSB for a period as long as the whole fattening in a *Salmonella*-infected unit.

It can be concluded that the administration of PSB at 3 kg/T for the whole fattening period was able to reduce seroprevalence before slaughter, which may reflect a positive effect on the control of *Salmonella* at the end of the fattening period.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology –INIA- (ref. no. RTA2012-24) and the Government of Aragón (ref. DRU no. 2012-02-22-541-00-IFO-00770020052). ACH is the recipient of a national fellowship (ref. no. INIA-FPI 2014). We thank AGROPIENSO SCL and the farmer for their collaboration to carry out all the field work.

References

- Anon. (2015) Commission notice: Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine. Official Journal of European Union of 11 September, C299/7-C299/26.
- Argüello, H., Carvajal, A., Costillas, S., Rubio, P., 2013. Effect of the addition of organic acids in drinking water or feed during part of the finishing period on the prevalence of *Salmonella* in finishing pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 842–849.
- CDC (Centers for Disease Control), 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States. (Retrieved on 22 November 2016 from <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>).
- Calveyra, J.C., Nogueira, M.G., Kich, J.D., Biesus, L.L., Vizzotto, R., Bemo, L., Goldebelli, A., Lopes, L., Morés, N., Lima, G.J., Cardoso, M., 2012. Effect of organic acids and mannanoligosaccharide on excretion of *Salmonella* Typhimurium in experimentally infected growing pigs. *Res. Vet. Sci.* 93, 46–47.
- Creus, E., Pérez, J.F., Peralta, B., Baucells, F., Mateu, E., 2007. Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. *Zoonoses Public Health* 54, 314–319.
- Dahl, J., Wingstrand, A., Nielsen, B., Baggesen, D.L., 1997. Elimination of *Salmonella* typhimurium infection by the strategic movement of pigs. *Vet. Rec.* 140, 679–681.
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 74, 417–433.
- De Busser, E.V., Dewulf, J., Nollet, N., Houf, K., Schwarzer, K., De Sadeleer, L., De Zutter, L., Maes, D., 2009. Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses. *Zoonoses Public Health* 56, 129–136.
- De Knecht, L.V., Pires, S.M., Hald, T., 2015. Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. *Epidemiol. Infect.* 143, 1175–1186.
- De Lange, C.F.M., Pluske, J., Gong, J., Nyachoti, C.M., 2010. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livest. Sci.* 134, 124–134.
- De Ridder, L., Maes, D., Dewulf, J., Pasmans, F., Boyen, F., Haesebrouck, F., Meroc, E., Butaye, P., Van Der Stede, Y., 2013. Evaluation of three intervention strategies to reduce the transmission of *Salmonella* Typhimurium in pigs. *Vet. J.* 197, 613–618.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14 (12), 4634.
- EMA (European Medicines Agency), 2014. Concept Paper on Use of Aminoglycosides in Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health. (Retrieved on 16 December 2016 from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/07/WC500170029.pdf).
- EMA (European Medicines Agency), 2016. Updated Advice on the Use of Colistin Products in Animals Within the European Union: Development of Resistance and Possible Impact on Human and Animal Health. (Retrieved on 16 December 2016 from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/05/WC500207233.pdf).
- Folster, J.P., Rickert, R., Barzilay, E.J., Whichard, J.M., 2009. Identification of the Aminoglycoside Resistance Determinants *armA* and *rmtC* among Non-Typhi *Salmonella* Isolates from Humans in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4563–4564.
- Friendship, R.M., Mouchili, A., McEwen, S., Rajic, A., 2009. Critical Review of On-farm Intervention Strategies Against *Salmonella*. (Retrieved on 22 November 2016 from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=412209087C463AD1F8D44F3A6C4556E5?doi=10.1.1.614.2811&rep=rep1&type=pdf>).
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J.C., Van Immerseel, F., 2006. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 946–949.
- Gebrey, E., Lee, J.S., Son, J.C., Yang, S.Y., Shin, S.A., Kim, B., Kim, M.K., Park, S.C., 2010. Effect of probiotic, bacteriophage, or organic acid-supplemented feeds or fermented soybean meal on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of grower pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J. Anim. Sci.* 88, 3880–3886.
- Gonzalez-Zorn, B., Teshager, T., Casas, M., Porrero, M.C., Moreno, M.C., Courvalin, P., Dominguez, L., 2005. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 954–956.
- Hurd, H.S., McKean, J.D., Griffith, R.W., Wesley, I.V., Rostagno, M.H., 2002. *Salmonella enterica* Infections in market swine with and without transport and holding. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2376–2381.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161–168.
- Martín-Peláez, S., Costabile, A., Hoyle, L., Rastall, R.A., Gibson, G.R., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Mateu, E., Martín-Orde, S.M., 2010. Evaluation of the inclusion of a mixture of organic acids or lactulose into the feed of pigs experimentally challenged with *Salmonella* Typhimurium. *Vet. Microbiol.* 142, 337–345.
- Merle, R., Kösters, S., May, T., Pörsch, U., Blaha, T., Kreienbrock, L., 2011. Serological *Salmonella* monitoring in German pig herds: results of the years 2003–2008. *Prev. Vet. Med.* 99, 229–233.
- Mousing, J., Jensen, P.T., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B., Nielsen, J.P., Bech-Nielsen, S., 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev. Vet. Med.* 29, 247–261.
- Nollet, N., Maes, D., Duchateau, L., Hautekiet, V., Houf, K., Van Hoof, J., De Zutter, L., De Kruij, A., Geers, R., 2005. Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet. Res.* 36, 545–555.
- Papenbrock, S., Stemme, K., Amsberg, G., Verspohl, J., Kamphues, J., 2005. Investigations on prophylactic effects of coarse feed structure and/or potassium diformate on the microflora in the digestive tract of weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 89, 84–87.
- Partanen, K.H., Mroz, Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.* 12, 117–145.
- Piva, A., Pizzamiglio, V., Morlacchini, M., Tedeschi, M., Piva, G., 2007. Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine. *J. Anim. Sci.* 85, 486–493.
- Rostagno, M.H., Hurd, H.S., McKean, J.D., Ziemer, C.J., Gailey, J.K., Leite, R.C., 2003. Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4489–4494.
- Scherer, K., Szabó, I., Rösler, U., Appel, B., Hensel, A., Nöckler, K., 2008. Time course of infection with *Salmonella* Typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *J. Food Prot.* 71, 699–705.
- van der Wolf, P.J., van Schie, F.W., Elbers, A.R., Engel, B., van der Heijden, H.M., Hunneman, W.A., Tielen, M.J., 2001a. Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections. *Vet. Q.* 23, 121–125.
- van der Wolf, P.J., Fo, Lo, Wong, D.M., Wolbers, W.B., Elbers, A.R., van der Heijden, H.M., van Schie, F.W., Hunneman, W.A., Willeberg, P., Tielen, M.J., 2001b. A longitudinal study of *Salmonella enterica* infections in high- and low-seroprevalence finishing swine herds in The Netherlands. *Vet. Q.* 23, 116–121.
- Van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timmermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2005. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult. Sci.* 84, 1851–1856.
- Vico, J.P., Engel, B., Buist, W.G., Mainar-Jaime, R.C., 2010. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. *Zoonoses Public Health* 57, 107–114.
- Walia, K., Argüello, H., Lynch, H., Leonard, F.C., Grant, J., Yearsley, D., Kelly, S., Duffy, G., Gardiner, G.E., Lawlor, P.G., 2016. Effect of feeding sodium butyrate in the late finishing period on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Pre. Vet. Med.* 131, 79–86.
- Wilhelm, B., Rajić, A., Parker, S., Waddell, L., Sanchez, J., Fazil, A., Wilkins, W., McEwen, S.A., 2012. Assessment of the efficacy and quality of evidence for five on-farm interventions for *Salmonella* reduction in grow-finish swine: a systematic review and meta-analysis. *Prev. Vet. Med.* 107, 1–20.

PUBLICACIÓN IV / PUBLICATION IV

Use of a new form of protected sodium butyrate to control *Salmonella* infection in fattening pigs

Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C.

Spanish Journal of Agricultural Research 2018, 16(4):e05SC02



SHORT COMMUNICATION

OPEN ACCESS

Use of a new form of protected sodium butyrate to control *Salmonella* infection in fattening pigs

Alejandro Casanova-Higes¹, Sara Andrés-Barranco¹, and Raúl C. Mainar-Jaime²

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Unidad de Producción y Sanidad Animal. Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, Spain. ²Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2). Dpt. de Patología Animal. Avda. Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain.

Abstract

A field trial on a commercial pig farm was carried out to assess the efficacy of the addition in the diet of fattening pigs of a new form of sodium butyrate protected with a sodium salt of coconut fatty acid distillate (3 kg/ton of feed) to control *Salmonella* spp. infection. Around 50 pigs were assigned to treatment group and 50 kept as controls. During the fattening period pigs were monthly sampled (serum and feces), and after slaughter fecal and mesenteric lymph nodes samples were collected. No differences in the proportion of shedders were observed between the sodium butyrate and the control groups, but a significant reduction in the number of infected pigs (61% vs. 4%; $p < 0.01$) and in the median ELISA Optical Density percentage values (55.9% vs. 19.4%; $p < 0.01$) at slaughter was observed in pigs under treatment compared to the controls. In addition, an overall significant association between seropositivity and *Salmonella* shedding and infection was detected. Results from this study add more evidences on the positive effect of butyrate on the control of pig salmonellosis.

Additional keywords: swine; organic acids; salmonellosis; feed; zoonoses.

Abbreviations used: CG (control group); MLN (mesenteric lymph nodes); OA (organic acids); OD% (optical density %); SFCA (short-chain fatty acids); TG (treatment group).

Authors' contributions: All the authors contributed on the design, sampling, data analysis and wrote and approved the final manuscript.

Citation: Casanova-Higes, A.; Andrés-Barranco, S.; Mainar-Jaime, R. C. (2018). Short communication: Use of a new form of protected sodium butyrate to control *Salmonella* infection in fattening pigs. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 16, Issue 4, e05SC02. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018164-13888>

Received: 03 Sep 2018. **Accepted:** 30 Nov 2018.

Copyright © 2018 INIA. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-by 4.0) License.

Funding: National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, INIA (RTA2012-24); Government of Aragón (DRU 2012-02-22-541-00-IFO-00770020052). ACH is the recipient of a national fellowship (INIA-FPI 2014).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Correspondence should be addressed to Raúl C. Mainar-Jaime: rcmainar@unizar.es

Introduction

Subclinical *Salmonella* infection is common in fattening pigs, and infected pigs are responsible for *Salmonella* carcass contamination at slaughter, making the consumption of pig meat and products thereof a main vehicle of human infections (EFSA & ECDC, 2017). However, considering the alarming increase of antimicrobial resistance worldwide, the preventative use of antibiotics for controlling this pig infection is not advisable (OJEU, 2015).

A vast market of feed additives (*i.e.* essential oils, organic acids, plant extracts, etc.) with potential antimicrobial effects against enteric infections has been developed in recent times. Among organic acids (OA), the butyric acid, a component of the short-chain

fatty acids (SFCA) obtained by degradation of fiber by colonic microbiota, has been one of the most studied due to its antimicrobial properties and down-regulating effects in some *Salmonella* virulence genes (Gantois *et al.*, 2006). However, results are often variable and difficult to compare due to different study designs (*i.e.* dosage or treatment period, production phase, level of exposure, etc.) (Creus *et al.*, 2007; De Busser *et al.*, 2009; Michiels *et al.*, 2012; Walia *et al.*, 2016, 2017; Lynch *et al.*, 2017).

In a recent article we reported a form of sodium butyrate protected with vegetable fat that showed some promising results for the control of *Salmonella* infection in pigs (Casanova-Higes *et al.*, 2017). In the current study we present the results of an additional field trial assessing the efficacy of the same sodium butyrate

formula protected with a different encapsulation, *i.e.* a sodium salt of coconut fatty acid distillate. This distillate is composed by lauric acid along with capric and caprylic acids, which have been also described as fatty acids with antimicrobial properties (Rossi *et al.*, 2010; Dayrit, 2015).

Material and methods

The trial was carried out between October 2016 and February 2017 in a small (100 pigs, 8 pens) commercial *Salmonella*-contaminated (identified through serology and microbiology of previous batches) fattening unit located in the NE of Spain. The additive used (DICOSAN+, Norel S.A., Madrid, Spain) is a form of sodium butyrate protected with a sodium salt of coconut fatty acid distillate. Lauric acid is the most abundant fatty acid in coconut oil (45-53%) along with capric and caprylic acids ($\approx 10\%$).

DICOSAN+ was administrated to the feed in a single dose of 3 kg/ton of feed. The compound feed was provided in 40-kg bags and manually administered to four randomly selected pens (50 animals, treatment group: TG) by the farmer, who was unaware of the treatment allocation. The remaining four pens were fed with the same regular diet without the fatty acid (control group: CG). The treatment was initiated 15 days after pigs entered into the fattening unit (≈ 10 weeks-old pigs) and lasted until slaughter (3.5 months later).

Serum samples from all pigs were collected after 30, 60 and 90 days on the fattening unit, and within the last week before slaughter (≈ 110 days). On-farm fecal samples (a minimum of 25 g of feces) were collected in sterile containers along with the blood from

approximately 25 pigs per group. Since fecal material was collected either after spontaneous defecation or by rectal stimulation, to reduce the risk of environmental contamination of the sample, the final number of sampled pigs varied between 24 and 26 per group, but at least 5 pigs from each pen were included in each sampling to make sure the sampling of all pens (Table 1). At slaughter, fecal and mesenteric lymph nodes (MLN) samples were collected from all pigs after evisceration.

Salmonella isolation from on-farm and slaughter fecal samples as well as from MLN samples was performed following the Standard ISO 6579:2002/ Amd 1:2007. Serum samples were kept at -20°C until serological test was performed. The Herdcheck Swine *Salmonella* ELISA test (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, US) was used for detection of specific antibodies (IgG) against *Salmonella* spp. and results recorded as optical density % (OD%) values following manufacturer's instructions. Given the low specificity of the ELISA test (Vico *et al.*, 2010) and as suggested in previous studies (Nollet *et al.*, 2005), a cut-off value of $\text{OD}\% \geq 40$ was considered for seroprevalence estimates.

Repeated measures analysis was used to estimate differences in median OD% values in each group (STATA, StataCorp LP, USA). The effects of sampling time (within-subject factor), and treatment (between-subject factor), and the corresponding interactions among them, on OD% values during the fattening period were assessed by general linear models repeated measures analysis of variance (ANOVA). Fisher exact test was used to assess statistical differences between the CG and the TG regarding the proportion of *Salmonella* shedders at different sampling times, the infection prevalence (proportion of MLN-positive pigs)

Table 1. Microbiological results for *Salmonella* spp. isolation (ISO 6579:2002/ Amd 1:2007) for on-farm fecal samples (OF) after 30, 60 and 90 days in the fattening unit and for mesenteric lymph nodes (MLN) and fecal samples at slaughter (SF) for the Control (CG) and Treatment (TG) groups.

			CG	TG	<i>p</i> *
Fattening unit	OF at 30d	No.	24	25	
		No. + (%)	22 (87.5)	17 (72)	0.07
	OF at 60d	No.	25	25	
		No. + (%)	4 (16)	3 (12)	1
	OF at 90d	No.	24	26	
		No. + (%)	3 (14.2)	0 (0)	0.1
Slaughter	SF	No.	45	46	
		No. + (%)	7 (15.5)	5 (10.8)	0.55
	MLN	No.	45	46	
		No. + (%)	17 (60.7)	2 (4.3)	0.0001

*p**: Fisher exact test, two-tailed.

and the seroprevalence at slaughter. Logistic regression analysis was used to assess, at pig level, the overall relationship between being a seropositive pig (OD% ≥ 40) and shedding and infection at slaughter. A two-tailed p -value ≤ 0.05 was considered for significance in all comparisons.

Results and discussion

The fatty acid considered was a new form of sodium butyrate protected with sodium salt of coconut fatty acid distillate, which contains several organic acids that had already shown some antimicrobial properties (Rossi *et al.*, 2010; Dayrit, 2015). Thus, we assessed whether this combination of acids may exert some control on pig *Salmonella* infection when used on a commercial fattening unit known to be consistently contaminated with *Salmonella* spp.

At the beginning of the trial (day 30) both the CG and the TG showed a large proportion of shedders (Table 1). Since recently infected pigs become *Salmonella* shedders quickly after infection and for a median of 14 days (Pires *et al.*, 2013), after which they usually turn into a stage of intermittent shedding, this finding would be compatible with an early exposure to *Salmonella* at the beginning of the fattening period. Further fecal samplings showed a reduction of the number of shedding pigs in both groups but no significant differences between them. This reduction in the proportion of shedders along the fattening period would be likely related to the expected intermittent shedding described above and usually occurring 2 or 3 weeks after the primary infection (Scherer *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2013). In the TG however, this reduction could be also associated, at least partially, with the destruction of the pathogen in the intestinal lumen due to the presence of the organic acids (*i.e.* through the lowering of extra- and intra- cellular pH). In fact, considering the large number of pigs shedding *Salmonella* on day 30 in the TG (72%), a large number of infected (MLN positive) pigs at slaughter would have been expected in this group. However, the proportion of infected pigs at slaughter in the TG was very low (4%) and significantly lower than that in the CG (61%), which supported the protective effect against infection of this form of organic acid (Rasschaert *et al.*, 2016). It appeared that the treatment could have prevented bacteria translocation to MLN despite the initial high levels of exposure to *Salmonella*.

The low number of pigs shedding *Salmonella* at slaughter was also an unexpected finding, particularly in the CG, as shedding in *Salmonella*-infected pigs is usually favored by stress-producing factors such as the transport to the slaughter and also the lairage (Rostagno

et al., 2003). This result may be partially explained by the short time periods for transport and lairage in this study. Transport lasted only for half an hour and lairage was less than 2 hours, which may have contributed to low levels of stress in these pigs. Regarding the TG, since the presence of *Salmonella* in MLN seems to be associated to shedding at slaughter (Casanova-Higes *et al.*, 2018), the low proportion of MLN-positive pigs in this group would explain the small proportion of shedders detected.

Seroprevalence was similar on day 30 for both groups (26.9% in the CG vs. 25% in the TG), which indicated that both groups started the trial from a similar epidemiological situation. In subsequent samplings seroprevalence remained consistently and significantly lower ($p < 0.01$) for the TG (Fig. 1). The repeated measures analysis showed a significant overall interaction between treatment and time. For the TG, median OD% values rose significantly from the first (OD%=14.9) to the second sampling (OD%=28.4), but began to decrease after that. Median OD% values on day 90 and prior to slaughter (OD%=14.9 and 19.4, respectively) were similar to the median OD% value found on day 30 (Fig. 2). However, in the CG an overall increasing trend of OD% values was observed, from 19.4 on day 30 to 58.3 at slaughter (Fig. 2). At pig level, a positive relationship between seropositivity and shedding/infection at slaughter was observed. A seropositive pig (OD% ≥ 40) had 9 times (OR= 9.2; 95%CI: 1.9, 45.3; $p=0.003$) higher odds of shedding *Salmonella* at slaughter and 4 times (OR= 4.1; 95%CI: 1.4, 12.4; $p=0.003$) higher odds of being infected than a seronegative pig (OD% < 40). All together, these results suggested an overall preventive effect of this organic acid against further *Salmonella* exposure. The relationship observed between seropositivity on days prior to slaughter and shedding/infection supported previous hypothesis that on-farm seropositivity could

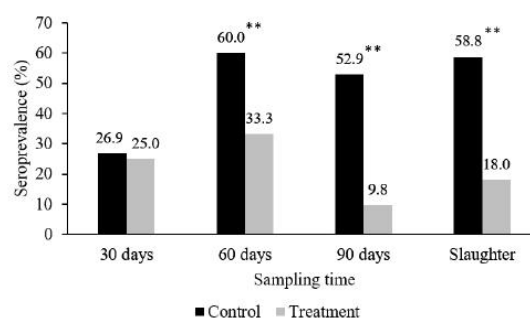


Figure 1. *Salmonella* seroprevalence (cut-off value OD% ≥ 40 ; Herdcheck Swine *Salmonella* ELISA test, IDEXX Laboratories, US) at different sampling times in the fattening period in the control and treatment group. **: $p \leq 0.01$

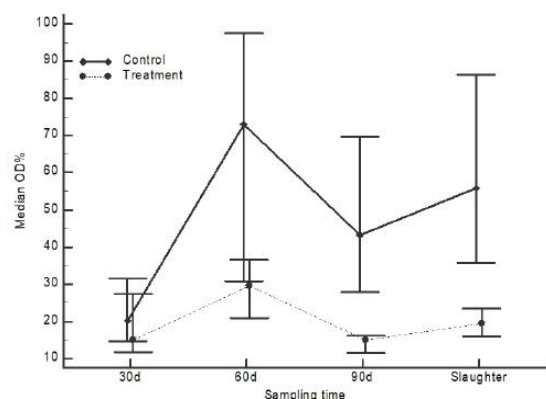


Figure 2. Median optical density percentage values (Median OD%) (Herdcheck Swine *Salmonella* ELISA test, IDEXX Laboratories, US) and their corresponding 95% confident intervals at the different sampling times (30, 60, 90 days on fattening and prior to slaughter) for the control and treatment groups.

be considered an indicator of the risk of *Salmonella* shedding at slaughter (Mainar-Jaime *et al.*, 2018).

Overall results from this study seem to be somewhat better than those previously obtained from a similar study with the same product protected with vegetable fat (Casanova-Higes *et al.*, 2017). The use of sodium salts of organic acids (such as lauric, capric and caprylic), besides protecting the sodium butyrate against its early dissociation in the stomach, may enhance the product antimicrobial effect, through interfering with cell membrane and cellular processes (Dayrit, 2015). As a result, a synergic effect could be expected from the combination of sodium butyrate with this protecting ingredient. These results add more evidences on the positive effect of butyrate on the control of pig salmonellosis, but more studies on dosage, treatment periods and duration will be required to optimize this approach.

Acknowledgements

We thank AGROPIENSO SCL, the farmers and abattoir for their collaboration.

References

- Casanova-Higes A, Andrés-Barranco S, Mainar-Jaime RC, 2017. Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigs. *Anim Feed Sci Tech* 231: 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.06.008>
- Casanova-Higes A, Andrés-Barranco S, Mainar-Jaime RC, 2018. Influence of on-farm pig *Salmonella* status on *Salmonella* Shedding at slaughter. *Zoonoses Public Health* 64 (5): 328-336. <https://doi.org/10.1111/zph.12301>
- Creus E, Perez JF, Peralta B, Baucells F, Mateu E, 2007. Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. *Zoonoses Public Health* 54 (8): 314-319. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01069.x>
- Dayrit FM, 2015. The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *J Am Oil Chem Soc* 92: 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2562-7>
- De Busser EV, Dewulf J, Nollet N, Houf K, Schwarzer K, De Sadeleer L, DeZutter L, Maes D, 2009. Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses. *Zoonoses Public Health* 56 (3): 129-136. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01172.x>
- EFSA & ECDC, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J* 15 (12): 5077-5305.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC, Van Immerseel, F, 2006. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* 72 (1): 946-949. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.946-949.2006>
- Lynch H, Leonard FC, Walia K, Lawlor PG, Duffya G, Fanning S, Markey BK, Brady C, Gardiner GE, Argüello H, 2017. Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Prev Vet Med* 139 (pt A): 50-57.
- Mainar-Jaime RC, Casanova-Higes A, Andrés-Barranco S, Vico JP, 2018. Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis. *Zoonoses Public Health* 65 (1): e222-e228. <https://doi.org/10.1111/zph.12432>
- Michiels J, Missotten J, Rasschaert G, Dierick N, Heyndrickx M, De Smet S, 2012. Effect of organic acids on *Salmonella* colonization and shedding in weaned piglets in a seeder model. *J Food Prot* 75 (11): 1974-1983. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-210>
- Nollet N, Maes D, Duchateau L, Hautekiet V, Houf K, Van Hoof J, De Zuttera L, De Kruif A, Geers R, 2005. Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet Res* 36 (4): 545-555. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005014>
- OJEU, 2015. Commission notice: Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine. Official Journal of European Union, 11 Sept; C299/7-C299/26.
- Pires AF, Funk JA, Bolin CA, 2013. Longitudinal study of *Salmonella* shedding in naturally infected finishing pigs. *Epidemiol Infect* 141 (9): 1928-1936. <https://doi.org/10.1017/S0950268812002464>

- Rasschaert G, Michiels J, Tagliabue M, Missotten J, De Smet S, Heyndrickx M, 2016. Effect of organic acids on *Salmonella* shedding and colonization in pigs on a farm with high *Salmonella* prevalence. *J Food Prot* 79 (1): 51-58. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-183>
- Rossi R, Pastorelli G, Cannata S, Corino C, 2010. Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets: A review. *Anim Feed Sci Tech* 162 (1-2): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.08.013>
- Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC, 2003. Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol* 69 (8): 4489-4494. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4489-4494.2003>
- Scherer K, Szabó I, Rösler U, Appel B, Hensel A, Nöckler K, 2008. Time course of infection with *Salmonella* Typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *J Food Prot* 71 (4): 699-705. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.4.699>
- Vico JP, Engel B, Buist WG, Mainar-Jaime RC, 2010. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. *Zoonoses Public Health* 57 (s1): 107-114. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01364.x>
- Walia K, Argüello H, Lynch H, Leonard FC, Grant J, Yearsley D, Kelly S, Duffy G, Gardiner GE, Lawlor PG, 2016. Effect of feeding sodium butyrate in the late finishing period on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Prev Vet Med* 131: 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.07.009>
- Walia K, Argüello H, Lynch H, Leonard FC, Grant J, Yearsley D, Kelly S, Duffy G, Gardiner GE, Lawlor PG, 2017. Effect of strategic administration of an encapsulated blend of formic acid, citric acid, and essential oils on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Prev Vet Med* 137 (Pt A): 28-35.

PUBLICACIÓN V / PUBLICATION V

Weaned piglets: another key factor for the control of *Salmonella* infection in breeding pig farms

Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M., Andrés-Barranco, S., Cebollada-Solanas, A., Álvarez, J., Mainar-Jaime, R.C.

Veterinary Research (en revisión)

Weaned piglets: another key factor for the control of *Salmonella* infection in breeding pig farms

Alejandro Casanova-Higes¹, Clara M^a Marín-Alcalá¹, Sara Andrés-Barranco¹, Alberto Cebollada-Solanas^{2,3}, Julio Alvarez^{4,5}, Raúl C. Mainar-Jaime^{6,*}

¹Unidad de Producción y Sanidad Animal. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2- (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, Spain. ²Grupo de Genética de Micobacterias, Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Zaragoza, Spain; CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ³Unidad de Biocomputación, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS/IIS Aragón), Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), 50009, Zaragoza, Spain. ⁴Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 28040, Spain. ⁵Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. ⁶Dpt. de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Instituto Agroalimentario de Aragón -IA2- (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain.

*corresponding author: Raul C. Mainar-Jaime. Avda. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza, Spain. E-mail: rcmainar@unizar.es

Keywords: Piglets, Prevalence, *Salmonella*, Infection, Shedding, PFGE, Zoonoses

Abstract

Field studies on *Salmonella* infection in suckling piglets are scarce due to the intrinsic difficulties of collecting proper samples (i.e. tonsils or mesenteric lymph nodes), and most of them rely on the analysis of rectal swabs that limit their accuracy. We used 495 slaughtered 4-weeks-old male piglets intended for human consumption from 5 *Salmonella*-seropositive breeding farms to collect gastrointestinal packages and perform a thorough study of *Salmonella* infection. The overall prevalence of infection and shedding was similar and high ($\approx 36\%$) indicating that piglets played an active role in *Salmonella* maintenance in the farms. Major serotypes found in piglets included 4,[5],12:i: (35.4%), Rissen (17.1%), Derby (10.9%) and Bovismorbificans (10.3%). In most of the infected animals (71.4%) genetically related isolates were found in mesenteric lymph nodes and feces. Significant higher ELISA OD% values were found in meat juice samples from non-infected piglets compared to infected ones (median OD% of 12.0 and 17.3, respectively; $P=0.002$) suggesting some protective effect of sow's colostrum. *Salmonella* was also isolated from feces from weaned sows contemporary of the slaughtered piglets, and 89% of the serotypes identified in sows were also detected in piglets. Pulsed field gel electrophoresis analyses showed that 75% of the piglet isolates that were compared to those of sows were related to them, suggesting the circulation of *Salmonella* strains between sows and piglets. It appears that improving both colostrum quality and its intake by piglets, along with the reduction of the shedding in sows, may favor the control of *Salmonella* infection in breeding farms.

List of abbreviations

BG: brilliant green agar.

CI: Confidence Interval.

EU: European Union.

FEC: fecal content.

IgG: Immunoglobulin G.

MJ: meat juice.

MLN: mesenteric lymph nodes.

MSRV: modified semisolid Rappaport Vassiliadis agar.

OD%: Optical Density percentage.

OR: Odds Ratio.

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

TSI: triple sugar iron agar.

XLD: xylosine lysine deoxycholate agar.

Introduction

Salmonellosis is the second most commonly reported bacterial foodborne infection in humans in the European Union (EU) after campylobacteriosis [1]. *Salmonella* spp. were the most frequently reported causative agents of food-borne and waterborne outbreaks in 2017, causing 24.4% of the outbreaks, which represented a moderate increase in EU compared to the 2014-2015 period. The consumption of contaminated pig meat and products thereof is considered one of the most important sources of human infection in *Salmonella* outbreaks in the EU [1]. Thus, Public Health authorities have advised on the need for control of *Salmonella* infection in swine, and several EU countries initiated National Control Programs to reduce its prevalence in the pig population [2].

Pig meat production is a complex process that may be divided in several clearly defined periods: lactation (from the piglet birth to weaning at 3-4 weeks of age), nursery (from weaning to around 2.5 months old or 20-25 kg live weight), and the growing and fattening period (from 20-25 kg to 90-110 kg live weight). The dynamics of *Salmonella* infection has been extensively studied during the latter period [3, 4, 5, 6, 7, 8], as fattening pigs are intended for human consumption and are considered the main source of *Salmonella* carcass contamination at slaughter [9, 10]. During this period there are multiple opportunities to collect samples either on farm (blood and feces) or at slaughter (blood, meat juice, gastrointestinal content, mesenteric lymph nodes tonsils or the carcasses). Altogether, this allows for a proper monitoring of *Salmonella* infection dynamics at this stage and therefore the implementation of suitable on-farm interventions. Thus, most control programs have focused on this period of fattening, and different interventions have been designed (i.e. better hygiene and biosecurity measures, minimizing animal stress, new feeding strategies such as the use of fermented feed or feed additives with antimicrobial properties, etc.) and implemented with more or less success to reduce the prevalence of infection on the farm.

In contrast, there is an important lack of information on the epidemiology of *Salmonella* infection in the previous production phases, i.e. lactation and nursery even though it may influence the dynamics of infection during the growing and fattening period [11]. During nursery, for example, piglets are highly vulnerable to enteric pathogens, such as *Salmonella* spp. [12, 13]. Bacterial colonization by these pathogens is favored by the intestinal dysbiosis commonly observed in weaned piglets after diet change (from milk-based feed to gross feed) and the stress associated with new environments and the comingling of pigs [13, 14]. However, scarce data on prevalence of *Salmonella* infection or shedding at this stage is available, likely due to the common use of in-feed antimicrobials (i.e. colistina, Zinc oxide) to prevent enteric

infections by Gram negative bacteria or, in some countries, as growth promoters. In addition, proper field studies assessing the prevalence of *Salmonella* infection in nursery pigs would be expensive, as they would require the unethical slaughter of a large number of young animals.

With regard to suckling piglets in intensive-reared pig farms, a few published studies suggest that the prevalence of *Salmonella* shedding is, in general, low (<10%) [3, 15, 16, 17, 18]. Even when pools of fresh feces were used, the mean prevalence of shedding in these piglets was <5% [19]. However, results from all these studies are based mostly on the analysis of a small amount of feces, in many occasions collected through rectal swabs. Sensitivity of bacteriology from fecal samples is known to be directly related to the amount of feces used for analysis [20, 21, 22], and thus these studies may have underestimated the true prevalence of *Salmonella* shedding. Besides, lack of *Salmonella* shedding does not necessarily prove absence of infection, as intermittent shedding has been observed in *Salmonella*-infected pigs [3, 23, 24, 25]. Since suckling piglets may act as a significant source of *Salmonella* for subsequent production phases, accurate information on the dynamics of *Salmonella* infection at the end of the lactation period would be of much interest for implementing preventive interventions at this stage.

Roasted piglet (the so-called “cochinillo asado” in Spanish) is a widespread delicatessen food consumed all over Spain. In 2016, more than 1.8 million weaned piglets were slaughtered for human consumption in specialized commercial abattoirs [26]. Thus, for the present study, we took advantage of the availability of these type of abattoirs to assess in a more accurate way the prevalence of *Salmonella* infection and shedding in a population of weaned piglets coming from high *Salmonella*-seroprevalence breeding farms. We also evaluated the serological status of these animals with regard to *Salmonella* specific antibodies to better understand the role that their presence may have on *Salmonella* infection at this age. All these results should help to shed more light on the mechanisms of transmission of this infection within infected breeding farms and design better methods for its control.

Materials and methods

Farm selection and collection of samples

Five (A, B, C, D and E) multiplier/supplier breeding farms presenting a high *Salmonella*-seroprevalence (i.e. sow seroprevalence ≈50%) from the Northeast part of Spain (one of the largest pig-production areas in Europe) and that showed their willingness to collaborate were included. Farm size ranged from 700 to a maximum of 940 sows. Sampling was carried out in two periods, between February 2012 and July 2013 (farms A, B and C), and March 2015 and April 2016 (D and E). In these breeding farms, female weaned piglets were reared as re-stocking gilts for pig production farms, while male weaned piglets were sent to the abattoir for meat. The

males were slaughtered when they reached ≥ 7 kg live weight, which usually occurred at weaning (≈ 4 weeks old -4 wo-). Thus, all the samples analyzed in this study belonged to male piglets of this age.

Piglet samplings were carried out along the year in one abattoir and they depended upon both piglet availability from the five selected farms and abattoir staff readiness for collaboration. The whole piglet intestinal packages were collected directly from the slaughter line every time that a sampling was scheduled. Samples were then submitted to the laboratory for processing within 24 hours. From each package the maximum possible amount of mesenteric lymph nodes (MLN) and as much fecal content (FEC) as possible (from the cecum to the rectum) were collected for bacteriological analysis. A piece of the diaphragm muscle was also collected for serological analysis.

To determine the most prevalent serotypes circulating in the farms, every 3-4 months during the period of piglet sampling, farm staff collected fecal samples directly from the rectum of 10-12 recently weaned sows. These sows were not directly related (i.e. dams) to the studied piglets, but were present in the farm at the same time that piglets were sent to slaughter.

In addition, serum samples from ≈ 120 sows (minimum 116, maximum 158) in each farm were available. They had been routinely collected every 3-4 months during the period of piglet sampling and within the frame of the official eradication campaign for Aujeszky's disease. These sows were not necessarily related to the piglets analyzed either, but they were used to assess the *Salmonella* serological status in the 5 farms.

Bacteriology

Bacteriology on both FEC and MLN samples was performed according to the EN ISO 6579:2002/A1:2007 [27]. Fresh MLN samples were first weighed, defatted, and externally decontaminated by dipping into absolute alcohol and further flaming. Afterwards, samples were homogenized in buffered peptone water (BPW) in 1:10 dilution and incubated for 18 ± 2 h at 37 ± 1 °C. Thereafter, 3 drops (33 μ l each) of incubated BPW were inoculated into a modified semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium, and plates were incubated for 24 ± 3 h at 41.5 ± 1 °C (negative samples were reincubated for an additional 24 h). One microliter of the presumptive *Salmonella* growth (detected by the halo generated in MSRV after 24 or 48 h) was transferred to two selective media (xylosine lysine deoxycholate [XLD] and brilliant green [BG] agars). Suspected colonies were confirmed biochemically (triple sugar iron [TSI] agar, urea agar, L-lysine decarboxylation medium, and indole reaction). One representative colony of *Salmonella* spp. from *Salmonella*-positive MLN and FEC samples was further serotyped at the National

Reference Laboratory for Animal Salmonellosis -NRLAS- (Madrid, Spain) following the White-Kauffmann-Le Minor scheme [28].

Pulsed-Field Gel Electrophoresis analysis

To assess the genetic relationship between *Salmonella* infection (i.e. MLN +) and *Salmonella* shedding (FEC +) for a given piglet, and between *Salmonella* infection in piglets and *Salmonella* shedding in sows, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis was performed on *Salmonella* isolates according to the Pulse-Net protocol [29] as described in detail by [30]. Due to budget restrictions, not all *Salmonella* isolates were analyzed by PFGE. Only isolates meeting the following criteria were considered for analysis:

1. For the assessment of the relationship of *Salmonella* infection and shedding in piglets: when the same *Salmonella* serotype was isolated from MLN and FEC samples from the same piglet, then these two isolates were analyzed by PFGE analysis. If this occurred in several piglets from the same farm and within the same batch, a maximum of two piglets were analyzed.
2. For the assessment of the relationship between *Salmonella* infection in piglets and *Salmonella* shedding in weaned sows: when the same *Salmonella* serotype was isolated from a piglet's MLN sample and from a fecal sample from any of the sows analyzed from the same farm. A maximum of two piglet isolates and two sow isolates per batch were analyzed.

The BioNumerics software (version 6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) was used to compare the PFGE patterns by cluster analysis.

Serology

Diaphragm muscle samples were frozen and thawed to obtain meat juice (MJ). Sow serum samples and piglet MJ were kept at -20 °C until their use. To detect specific antibodies (IgG) against *Salmonella* spp. in both type of samples, the Herdcheck Swine *Salmonella* ELISA test (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, US) was used following manufacturer's instructions. This test targets the main swine *Salmonella* serogroups (B, C1 and D). For piglets, results were presented as Optical Density percentage (OD%) values. In case sows, a cutoff-value of OD%≥40 was considered to classify a sow as seropositive. This threshold was selected given the low specificity of the ELISA test used [31, 32].

Statistical analyses

Piglet prevalence of infection and shedding and their corresponding 95% Confidence Intervals (95%CI) were estimated. Since the amount of MLN and FEC collected may differ among piglets and affect to bacteriological results, the amount of each type of sample was compared between piglets that yielded a *Salmonella* positive and negative result by means of the Mann-Whitney test for independent samples. The relationship between piglet shedding and infection was assessed by mixed logistic regression after adjusting by season and considering farm as a grouping factor (gllamm module in STATA). ELISA OD% values between *Salmonella*-infected and non-infected piglets were compared using the Kruskal-Wallis test. The software STATA (STATA/IC 12.1. Stata-Corp. LP, College Station, TX) was used for all statistical analyses.

Results

Salmonella isolation, serotyping and serology in piglets

A total of 495 MLN and FEC samples from 495 4-week weaned piglets were analysed. Piglets were sampled in all seasons but autumn due to abattoir availability. The distribution of the sampling by farm and their corresponding prevalences of infection (MLN+) and shedding (FEC+) are shown in Table 1. The overall prevalence of infection varied significantly between farms, ranging from 17.8 to 70.4% with an overall value of 36.0% (95%CI: 31.9, 40.3). The prevalence of shedding piglets also varied significantly between farms, with a similar overall value (35.4%; 95%CI: 31.3, 39.7).

A median of 7.6 gr (95% CI: 7.4-7.9) of MLN and of 27 gr (95%CI: 26.5-27.6) of FEC was collected. No significant differences in weights between FEC-positive and FEC-negative samples were observed (median of 26.8 gr and 27.1 gr, respectively; $P=0.60$). However, the weight for MLN-positive samples was significantly higher than that for MLN-negative samples (median of 8.2 gr and 7.3 gr, respectively; $P<0.001$).

All *Salmonella* isolates (175 from FEC samples and 178 from MLN samples) were serotyped. The monophasic variant of *S. Typhimurium* (*S.* 4,[5],12:i:) was the most frequent serotype (35.4%) recovered from FEC samples, followed by Rissen (17.1%), Derby (10.9%) and Bovismorbificans (10.3%). *Salmonella* 4,[5],12:i: was also the most frequent serotype (27.5%) in MLN samples, followed by Bovismorbificans (20.2%), Rissen (14%), and Derby (11.8%). Both 4,[5],12:i: and Derby were present in all the farms and in both type of samples. The distribution of the *Salmonella* serotypes by type of sample is shown in Table 2.

Salmonella was not detected in 267 (53.9%) of the sampled piglets, while positive results in both MLN and FEC samples were obtained for 125 (25.2%) of them. Of these, 91 (72.8%) showed the same serotype in both samples (Table 2). A significant association between the

isolation of *Salmonella* in MLN and FEC samples was observed: a MLN-positive piglet had around 10 times higher odds of shedding *Salmonella* than a MLN-negative piglet (OR = 10.27; CI: 6.31-16.86; $P < 0.001$) once the season and farm effects were accounted for (Table 3).

Overall, the median OD% value in all 495 animals was 15.9 (median 95%CI: 13.7-17.8). Significantly higher OD% values in MLN-negative piglets were observed compared to the MLN-positive ones (median of 17.3 vs. 12.0, respectively; $P = 0.002$). Similar results were found for FEC-negative piglets compared to FEC-positive piglets (17.2 vs. 12.3, respectively; $P = 0.016$).

Salmonella isolation, serotyping and serology in sows

A total of 214 fecal samples from weaned sows were collected. The overall prevalence of *Salmonella* shedding among those was 21.9% (95%CI: 16.9-27.9), but it varied significantly between farms, ranging from 2.1% to 40% (Table 4). The serotypes found in sows differed among farms (Table 2). The most frequent serotype was Anatum (31.9%) which was present in 3 farms (C, D and E), followed by Kapemba (25.5%; farms A and E), and Brandenburg (17%; farm B). In general, the serotypes most commonly detected in sows were also detected in piglets from the same farm (Table 2).

Six hundred and eighty-six sow serum samples were available from the official eradication campaign for Aujeszky's disease. The overall seroprevalence was 72% (95%CI: 68.5-75.2). Seroprevalence varied among farms, but it was always higher than 50% in all of them (Table 4).

PFGE

One hundred and nine *Salmonella* isolates from piglets met any of the criteria described above for performing PFGE analysis. Twenty-two of them were not included because they belonged to serotypes that could not be typed by this technique (i.e. Panama, Ohio and Kapemba). Thus, 87 (24.6%) piglet isolates (47 MLN and 40 FEC) out of 353 *Salmonella* isolates were analyzed by PFGE. Regarding sows, PFGE was performed on 19 (40.4%) out of the 47 *Salmonella* isolates.

Forty piglets showing the same *Salmonella* serotype in both MLN and FEC samples were selected for PFGE analysis. Sixteen different PFGE patterns were identified among the 80 isolates (Figure 1). In 97.5% (39) of the piglets, a PFGE homology $\geq 90\%$ was found between *Salmonella* isolates from MLN and FEC samples. In 22 (56.4%) of them a perfect match (100% homology) was observed.

In piglets from 4 farms (A, B, C and E) the genetic relationship between piglet infection and sow shedding could be assessed (the same serotype found in sow samples was found in at

least one of the piglets from the same farm –Table 2). Nineteen *Salmonella* isolates from sows and 20 isolates from piglets were compared by PFGE. The sow isolates were grouped into 7 different PFGE patterns (>90% genetic homology), and in 5 of them isolates from piglets were included (patterns I, III, IV, V, and IX –Figure 2). These 5 clusters comprised 75% of the piglet isolates analyzed.

The visual analysis of the dendrograms also allowed identifying long-term patterns of infection (Figures 1 and 2). Major piglets' serotypes showing $\geq 90\%$ PFGE homology were detected in several occasions within the same farm and sometimes with more than 200 days of difference (i.e. in farm A: Rissen; in B: Brandenburg; in C: Derby and Rissen; and in D: Bovismorbificans, Derby and 4,[5],12:i:-). Likewise, homologous *Salmonella* strains coming from piglets and sows were isolated more than 200 days apart in farm A (4,[5],12:i:-), C (Derby and Anatum), and E (Anatum). In addition, in farms A and B homologous *Salmonella* strains from sows were isolated more than 300 days apart (4,[5],12:i:- and Brandenburg, respectively).

Discussion

To the authors' knowledge, this is the first field study aiming at assessing the dynamics of *Salmonella* infection in slaughtered weaned piglets. These piglets were slaughtered for human consumption and were therefore considered clinically healthy and had not received any recent antibiotic treatment. These circumstances should have favored the detection of *Salmonella* in case of subclinical infection. At slaughter, whole intestinal packages were collected and a thorough bacteriological study was carried out in order to detect *Salmonella* from both MLN and FEC samples for a better assessment of the true prevalence of *Salmonella* infection and shedding at weaning, a pig production time scarcely studied [11]. Piglets belonged to farms where the mean within-herd sow seroprevalence remained very high ($\geq 50\%$; cut-off value OD% $\geq 40\%$) throughout the study, suggesting an active circulation of *Salmonella* while piglets were being weaned.

The overall proportion of *Salmonella* shedders in this population of weaned piglets was unexpectedly high (35.4%), although variable among farms (Table 1). It differed from previous studies that showed a much lower proportion of shedders at this age, with prevalences from zero to a maximum of 10.5% [3, 15, 16, 17, 18]. Considering the amount of fecal content analyzed (an average >25 gr per piglet), the sensitivity of bacteriology in this study may have been maximized by the use of a larger amount of FEC [20, 21, 22]. This may help to explain, at least in part, the overall higher prevalence of shedding observed when compared to previous studies, which may have likely underestimated the true level of *Salmonella* shedding due to the sampling method used (mostly rectal swabs) in those suckling piglets.

No previous surveys on prevalence of *Salmonella* infection were available at weaning. The overall prevalence was also strikingly high (36%) and virtually identical to that of shedding (Table 1). As many MLN as possible were collected from each piglet, amounting to an average of 8.1 gr of MLN per animal. Given the size of MLNs at this age this represents a substantial number of MLN that covered a large intestinal area, thus increasing the likelihood of detecting infected animals. Within each farm, the prevalence of *Salmonella* shedding and infection also seemed to match (Table 1), suggesting a likely relationship between infection and shedding in these piglets. In fact, more than 70% of the MLN-infected piglets shed *Salmonella*, while only 16.6% of the non-infected ones did. The odds of shedding *Salmonella* at weaning was 10 times higher (OR = 10.27; Table 3) for MLN-positive piglets than that for MLN-negative piglets. The presence of MLN-negative pigs shedding *Salmonella* at slaughter may be associated with false-negative results, as the weight of the analyzed MLNs in negative piglets was significantly lower than that in positive ones (median of 7.3 gr vs. 8.2 gr, respectively; $P < 0.001$), which may have implied a lower diagnostic sensitivity.

Experimental infections with *Salmonella* have shown that pigs shed *Salmonella* quickly after primary infection during approximately two weeks, after which they become intermittent shedders [3, 4, 23, 24, 25]. Given the age of these piglets (4 wo), it seems reasonable that most of these shedding piglets had been infected for first time during lactation. In 97.5% (39/40) of the piglets in which isolates of the same serotype were recovered from MLN and FEC a high genetic homology ($\geq 90\%$) between them was found, and in 55% of them (22/40) a 100% match was detected (Figure 1). These results confirmed the occurrence of active infections in these weaned piglets. The fact that they did not show clinical signs of disease emphasizes their active role for within-farm *Salmonella* maintenance in these breeding farms. Had these piglets not been slaughtered, this infection may have been controlled later during nursery by in-feed antimicrobials (i.e. aminoglycosides and polymyxins) that were commonly used as metaphylactic treatment against enteric Gram-negative bacteria. However, the current increasing trend in the occurrence of antimicrobial resistant bacteria prompted Animal Health Authorities to advice on the reduction of antibiotics in animal production [33]. Bearing in mind the *Salmonella* status of these weaned pigs, the consequences that limiting the use of antimicrobials at this stage may have on *Salmonella* dynamics in further production stages are yet uncertain, but they may account for the high levels of infection found in late production [18]. Thus, in absence of other antimicrobial strategies, the presence of *Salmonella* in weaned pigs should be considered an important risk factor of infection for slaughter pigs. Strategies to prevent *Salmonella* infection during lactation and its further transmission to nursery will be required.

The monophasic variant of *S. Typhimurium* (4,[5],12:i:-) was the most common serotype in piglets (31.4%), followed by Rissen (15.6%), Bovismorbificans (15.3%) and Derby (11.3%). This distribution did not match that of sows, in which Anatum (31.9%) and Kapemba (25.5%) were the most frequently found serotypes, followed by far by 4,[5],12:i:- and Bovismorbificans (8.5% both). This discrepancy may be related with the fact that only one representative colony from each positive sample was serotyped, but animals could have been infected by different *Salmonella* serotypes at the same time [34]. In addition, it could be the result of different susceptibilities to *Salmonella* infection in piglets and sows due to previous exposures, maturity of the immune system, and/or the differential infectiveness of the serotypes [35, 36, 37]. For example, *Salmonella* Typhimurium is known to be highly invasive [38] and more prone to be excreted after primary infection, particularly in young pigs [25].

The ELISA test used for serology on meat juice samples from piglets can detect specific immunoglobulins (IgG) against the main *Salmonella* serotypes found in pigs. Serological results showed significantly lower OD% values in *Salmonella*-infected compared to non-infected piglets (median OD% of 12.0 and 17.3, respectively; $P=0.002$). Seropositivity in all weaned pigs was anticipated after the suckling of sow's colostrum [39]. Maternally derived IgGs were expected to decrease shortly after birth, but then they would increase at 7 weeks of age due to the novo synthesis of immunoglobulins [40]. Thus, in these 4-week piglets, the IgGs detected by the ELISA were most likely derived from sow's colostrum [41]. The fact that OD% values were higher in non-infected piglets suggests some protective effect of the colostrum against *Salmonella* infection at this early age. Indeed, there are evidences from field studies showing that colostrum may be a critical factor to prevent *Salmonella* infection in piglets [42], and some experimental studies have shown that suckling pigs with higher antibody titres improved their resistance when challenged with *Salmonella* [43, 44]. Ensuring proper colostrum intake within the first hours of life should be a basic strategy to prevent *Salmonella* infection during lactation. Increasing the quality of colostrum (i.e. the amount of immunoglobulins) through vaccination of pregnant sows before farrowing should be considered another potential strategy to protect suckling piglets from infection [43, 45, 46, 47] and even *Salmonella* shedding in older pigs [48, 49].

Due to the stress associated with weaning, the post-weaning period seems to present higher risk for *Salmonella* shedding in sows [19, 50]. For this reason, recently weaned sows were sampled to determine the most prevalent on-farm circulating serotypes. Both the prevalence of shedding in weaned sows and the serotypes found were variable between farms (Tables 2 and 4). Overall prevalence of *Salmonella* shedding was higher (21.9%) than that reported in other studies with levels of seroprevalence similar to those found here [4, 15, 19, 50, 51]. This

difference may be attributed to methodological differences between studies, such as including sows of different parities, animal management and immune status.

In agreement with previous studies, the distribution of *Salmonella* serotypes in these sows differed from those commonly isolated from finishing pigs [15, 52, 53, 54]. We also found some different serotypes within the farms between sows and piglets. However, 89% of the serotypes detected in the sows were also found in piglets from the corresponding farm. In addition, despite the low number of isolates from sows (19) and piglets (20) that were compared by PFGE, 75% of the piglet isolates were grouped within a PFGE pattern that included at least one *Salmonella* isolate coming from sows. Altogether this suggests that, in these farms, *Salmonella* infection can be maintained between sows and piglets. The fact that some *Salmonella* clones were detected in the farms over long periods (>200 days) supports this hypothesis. Avoiding *Salmonella* shedding in sows seems to be crucial to prevent farm environmental contamination [19] and the subsequent infection of suckling piglets, which would end up shedding this pathogen later. The use of feeding strategies of proven efficacy in reducing *Salmonella* shedding on slaughter pigs such as fermented feed, organic acids or prebiotics [55, 56, 57, 58] may help to control the infection in sows as well.

In conclusion, prevalence of *Salmonella* infection in weaned piglets from *Salmonella*-positive breeding herds may be much higher than previously reported. This study shows that suckling piglets can become subclinically infected and act as active carriers of *Salmonella*. There was a close relationship between *Salmonella* infection in piglets and sows as the same serotypes were found in both populations. Colostrum intake may be a key factor to reduce the likelihood of piglet infection during lactation, but other on-farm strategies to reduce *Salmonella* shedding in sows are of utmost importance as well.

Acknowledgements

We thank pig production companies, farmers and the abattoir for their collaboration to carry out the field work and Sofía Samper for technical advice with the PFGE analysis.

Funding

This work was supported by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology -INIA- (ref. RTA2012-24). ACH is the recipient of a national fellowship (ref. INIA-FPI 2014).

Competing interest

The authors declare that no competing financial interests exist.

Author's contributions

ACH, CMMA, SAB and RCMJ have contributed to the design, sampling and laboratory analyses. ACH and RCMJ led the writing of the manuscript. ACS has contributed to the PFGE analysis and interpretation. JA has contributed to data analysis and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article is available in the Research Gate Repository, <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17677.79840>

References

1. EFSA, ECDC (2018) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2017. EFSA Journal 16:5500
2. EFSA (2006) Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on “Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production”. EFSA Journal 341:1-131
3. Beloeil PA, Chauvin C, Proux K, Rose N, Queguiner S, Eveno E, Houdayer C, Rose V, Fravalo P, Madec F (2003) Longitudinal serological responses to *Salmonella* enterica of growing pigs in a subclinically infected herd. Prev Vet Med 60:207-226
4. Kranker S, Alban L, Boes J, Dahl J (2003) Longitudinal study of *Salmonella* enterica serotype typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. J Clin Microbiol 41:2282-2288
5. Lo Fo Wong DM, Dahl J, Wingstrand A, van der Wolf PJ, von Altrock A, Thorberg BM (2004) A European longitudinal study in *Salmonella* seronegative- and seropositive-classified finishing pig herds. Epidemiol Infect 132:903–914
6. Mejia W, Casal J, Zapata D, Sanchez GJ, Martin M, Mateu E (2006) Epidemiology of *Salmonella* infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. Vet Rec 159:271-276
7. Hill AA, Simons RR, Kelly L, Snary EL (2016) A Farm Transmission Model for *Salmonella* in Pigs, Applicable to E.U. Member States. Risk Anal 36:461-481
8. Casanova-Higes A, Andrés-Barranco S, Mainar-Jaime RC (2016) Influence of on-farm pig *Salmonella* status on *Salmonella* shedding at slaughter. Zoonoses Public Health 64:328-336

9. Argüello H, Álvarez-Ordoñez A, Carvajal A, Rubio P, Prieto M (2013) Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *J Food Prot* 76:899–911
10. Swart A, Simons R, Evers E, Snary E, Swanenburg M (2016) Modeling of *Salmonella* contamination in the pig slaughterhouse. *Risk Anal* 36:498–515
11. Wales AD, Cook AJ, Davies RH (2011) Producing *Salmonella*-free pigs: a review focusing on interventions at weaning. *Vet Rec* 168:267–276
12. Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH (1997) Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest Prod Sci* 51:215–236
13. Lallès JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR (2007) Weaning – A challenge to gut physiologist. *Livest Sci* 108:82–93
14. Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J (2013) The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol* 4:19
15. Funk JA, Davies PR, Nichols MA (2001) Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production system. *Vet Microbiol* 83:45–60
16. Barber DA, Bahnson PB, Isaacson R, Jones CJ, Weigel RM (2002) Distribution of *Salmonella* in Swine Production Ecosystems. *J Food Prot* 65:1861–1868
17. Roesler U, Vonaltrock A, Heller P, Bremerich S, Arnold T, Lehmann J, Waldmann KH, Truyen U, Hensel A (2005) Effects of fluorequinolone treatment acidified feed, and improved hygiene measures on the occurrence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in an integrated pig breeding herd. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52:69–74
18. Schut CH, Farzan A, Ainslie-Garcia MH, Friendship RM, Lillie BN (2018) Antibody Responses to *Salmonella* in Pigs from Weaning Up to Marketing and Presence of *Salmonella* at Slaughter. *Foodborne Pathog Dis* [Epub ahead of print]
19. Lynch H, Walia K, Leonard FC, Lawlor PG, Manzanilla EG, Grant J, Duffy G, Gardiner GE, Cormican M, King J, Markey BK, Fanning AS, Argüello H (2018) *Salmonella* in breeding pigs: Shedding pattern, transmission of infection and the role of environmental contamination in Irish commercial farrow-to- finish herds. *Zoonoses Public Health* 65:e196–e206
20. Hurd HS, Stabel TJ, Carlson S (1999) Sensitivity of various fecal sample collections techniques for detection of *Salmonella* typhimurium in finish hogs. *Proceeding of the Third International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington DC, August 1999
21. Funk JA, Davies PR, Nichols MA (2000) The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella* enterica in swine feces. *J Vet Diagn Invest* 12:412–418

22. Sangvatanakul P (2007) Prevalence of *Salmonella* in piglets and in the fattening period in Chiang Mai, Thailand. Master Thesis, Veterinary Public Health, Chiang Mai University and Freie Universität Berlin
23. Nielsen B, Baggesen D, Bager F, Haugegaard J, Lind P (1995) The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examination. Vet Microbio 47:205–218
24. Scherer K, Szabó I, Rösler U, Appel B, Hensel A, Nöckler K (2008) Time course of infection with *Salmonella* typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. J Food Prot 71:699–705
25. Pires AF, Funk JA, Bolin CA (2013) Longitudinal study of *Salmonella* shedding in naturally infected finishing pigs. Epidemiol Infect 141:1928–1936
26. MAPAMA (2018) El sector de la carne de cerdo en cifras: principales indicadores económicos 2017. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, España.
https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicoscarnedecerdo2017comentarios_tcm30-379728.pdf Accessed 5 Dec 2018
27. Anonymous (2007). ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (E): Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples from the primary production stage. International Organization for Standardization.
http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=42109 Accessed 29 May 2017
28. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol 165:526-530
29. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis 3:59-67
30. Andrés S, Vico JP, Garrido V, Grilló MJ, Samper S, Gavín P, Herrera-León S, Mainar-Jaime RC (2013) Epidemiology of Subclinical Salmonellosis in Wild Birds from an Area of High Prevalence of Pig Salmonellosis: Phenotypic and Genetic Profiles of *Salmonella* Isolates. Zoonoses Public Health 60:355-365

31. Nollet N, Maes D, Duchateau L, Hautekiet V, Houf K, Van Hoof J, De Zuttera L, De Kruif A, Geers R (2005) Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet Res* 36:545-555
32. Vico JP, Engel B, Buist WG, Mainar-Jaime RC (2010) Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. *Zoonoses Public Health* 57:107-114
33. Anonymous (2015) Commission notice: Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine. *Official Journal of European Union* C299:7-26
34. Garrido V, Sánchez S, San Roman B, Zabala-Baranquá A, Díaz-Tendero Y, de Frutos C, Mainar-Jaime RC, Grilló MJ (2014) Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs. *BMC Vet Res* 7:10-59
35. Letellier A, Messier S, Pare J, Menard J, Quessy S (1999) Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. *Vet Microbiol* 67:299–306
36. Ivanek R, Österberg J, Gautam R, Sternberg Lewerin S (2012) *Salmonella* Fecal Shedding and Immune Response are Dose- and Serotype- Dependent in Pigs. *PLoS One* 7:e34660
37. Gragg SE, Loneragan GH, Nightingale KK, Brichta-Harhay DM, Ruiz H, Elder JR, Garcia LG, Miller MF, Echeverry A, Ramírez Porras RG, Brashears MM (2013) Substantial within-Animal Diversity of *Salmonella* Isolates from Lymph Nodes, Feces, and Hides of Cattle at Slaughter. *Appl Environ Microbiol* 79:4744-4750
38. Cardona N, Sánchez M (2005) Evaluación de la capacidad de invasión de serovariedades de *Salmonella enterica* a células Hep-2. *CES Med* 19:7-17
39. Haye SN, Kornegay ET (1979) Immunoglobulin G, A and M and Antibody Response in Sow-Reared and Artificially-Reared Pigs. *J Anim Sci* 48:1116-1122
40. Bianchi AT, Moonen-Leusen HW, van der Heijden PJ, Bokhout BA (1995) The use of a double antibody sandwich ELISA and monoclonal antibodies for the assessment of porcine IgM, IgG and IgA concentrations. *Vet Immunol Immunopathol* 44:309-317
41. Sutherland MA, Rodriguez-Zas SL, Ellis M, Salak-Johnson JL (2005) Breed and age affect baseline immune traits, cortisol, and performance in growing pigs. *J Anim Sci* 83:2087-2095
42. zu Sundern AS, Holling C, Rohn K, Schulte-Wülwer J, Deermann A, Visscher C (2018) Relationships between colostrum supply of suckling piglets and *Salmonella* prevalence in piglet rearing. *Porcine Health Manag* 4:9
43. Roesler U, Heller P, Waldmann KH, Truyen U, Hensel A (2006) Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella* Typhimurium infection in the offspring. *J Vet Med B* 53:224–228

44. Matiasovic J, Kudlackova H, Babickova K, Stepanova H, Volf J, Rychlik I, Babak V, Faldyna M (2013) Impact of maternally derived antibodies against *Salmonella* enterica serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. *Vet J* 196:114–115
45. Hur J, Lee JH (2010) Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis. *Vet Microbiol* 143:270–276
46. Hur J, Song SO, Lim JS, Chung IK, Lee JH (2011) Efficacy of a novel virulence gene-deleted *Salmonella* Typhimurium vaccine for protection against *Salmonella* infections in growing piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 139:250–256
47. Wales AD, Davies RH (2017) *Salmonella* vaccination in pigs: A review. *Zoonoses Public Health* 64:1–13
48. De la Cruz ML, Conrado I, Nault A, Pérez A, Domínguez L, Álvarez J (2017) Vaccination as a control strategy against *Salmonella* infection in pigs: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Res Vet Sci* 114:86-94
49. Smith RP, Andres V, Martelli F, Gosling B, Marco-Jimenez F, Vaughan K, Tchorzewska M, Davies R (2017) Maternal vaccination as a *Salmonella* Typhimurium reduction strategy on pig farms. *J Appl Microbiol* 124:274-285
50. Nollet N, Houf K, Dewulf J, De Kruif A, De Zutter L, Maes D (2005) *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Vet Res* 36:645-656
51. Rowe TA, Leonard FC, Kelly G, Lynch PB, Egan J, Quirke AM, Quinn PJ (2003) *Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pig farms. *Vet Rec* 153:453-456
52. Davies PR, Morrow WE, Jones FT, Deen J, Fedorka-Cray PJ, Harris IT (1997) Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Epidemiol Infect* 119:237-244
53. Parada J, Carranza AI, Pichel M, Tamiozzo PJ, Pelliza BR, Ambrogi A (2013) *Salmonella* transmission from the gilt to her offspring. *Livest Sci* 157:605-611
54. Argüello H, Carvajal A, Naharro G, Arcos M, Rodicio M R, Martin M C, Rubio P (2013) Sero- and genotyping of *Salmonella* in slaughter pigs, from farm to cutting plant, with a focus on the slaughter process. *Int J Food Microbiol* 161:44-52
55. Andrés-Barranco S, Vico JP, Grilló MJ, Mainar-Jaime RC (2014) Reduction of subclinical *Salmonella* infection in fattening pigs after dietary supplementation with a β -galactomannan oligosaccharide. *J Appl Microbiol* 118:284-294
56. Casanova-Higes A, Andrés-Barranco S, Mainar-Jaime RC (2017) Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigs. *Anim Feed Sci Technol* 231:12-18

57. Lynch H, Leonard FC, Walia K, Lawlor PG, Duffy G, Fanning S, Markey BK, Brady C, Gardiner GE, Argüello H (2017) Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Prev Vet Med* 139:50-57
58. Tran THT, Everaert N, Bindelle J (2018) Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 102:17-32

Table 1. Results for *Salmonella* isolation* from fecal content and mesenteric lymph nodes in 4-weeks-old piglets.

Farm	No. of piglets	No. of FEC+ (%)	No. of MLN+ (%)	No. of FEC+ and MLN+ (%)**
A	105	30 (28.6)	19 (18.1)	15 (44.1)
B	118	16 (13.6)	21 (17.8)	6 (19.4)
C	99	36 (36.4)	29 (29.3)	20 (44.4)
D	92	42 (45.7)	52 (56.5)	38 (67.9)
E	81	51 (63.0)	57 (70.4)	46 (74.2)
Total	495	175 (35.4)	178 (36.0)	125 (54.8)

*ISO 6579:2002/Amd 1:2007

**Percentage estimated from positive (either FEC or MLN) piglets

FEC: fecal content, MLN: Mesenteric lymph nodes

Table 2. Distribution of the *Salmonella* serotypes in piglets and sows isolates among the 5 farms.

Farm	Piglets isolates				No. of piglets with the same serotype in MLN-FEC	Sows fecal isolates	
	FEC		MLN			Serotype	No. (%)
	Serotype	No. (%)	Serotype	No. (%)			
A	4,[5],12:i:-	12 (40)	4,[5],12:i:-	8 (42)	4	Kapemba	11 (68.7)
	Muenchen	5 (16.7)	Muenchen	3 (15.8)	1	4,[5],12:i:-	4 (25)
	Kapemba	5 (16.7)	Kapemba	2 (10.5)	1	Rissen	1 (6.3)
	Rissen	5 (16.7)	Rissen	2 (10.5)	1		
	Derby	2 (6.6)	Derby	2 (10.5)	1		
	Bredeney	1 (3.3)	Typhimurium	2 (10.5)			
B	Derby	7 (43.8)	Derby	8 (38.1)	6	Brandenburg	8 (88.9)
	Typhimurium	4 (25)	Typhimurium	2 (9.5)		Goldcoast	1 (11.1)
	Anatum	2 (12.5)	Anatum	1 (4.8)			
	4,[5],12:i:-	1 (6.3)	4,[5],12:i:-	2 (9.5)			
	Brandenburg	1 (6.3)	Brandenburg	2 (9.5)			
	Rissen	1 (6.3)	Rissen	5 (23.1)			
			Infantis	1 (4.8)			
C	Rissen	23 (63.9)	Rissen	17 (58.6)	14	Anatum	7 (53.8)
	Infantis	4 (11.1)				Bovismorbificans	4 (30.8)
	4,[5],12:i:-	2 (5.5)	4,[5],12:i:-	5 (17.2)	1	London	1 (7.7)
	Anatum	2 (5.5)	Anatum	1 (3.5)	1	Typhimurium	1 (7.7)
	Derby	2 (5.5)	Derby	2 (6.9)			
	London	2 (5.5)	Bovismorbificans	1 (3.5)			
	Agona	1 (2.2)	Agona	3 (10.3)	1		
D	4,[5],12:i:-	34(81)	4,[5],12:i:-	22 (42.3)	17	Anatum	1 (100)
	Bovismorbificans	4 (9.5)	Bovismorbificans	21 (40.4)	4		
	Derby	3 (7.1)	Derby	2 (3.8)	2		
	Brandenburg	1 (2.4)	Brandenburg	4 (7.7)			
			Rissen	1 (1.9)			
			Typhimurium	1 (1.9)			
			Muenchen	1 (1.9)			

FEC: fecal content, MLN: Mesenteric lymph nodes.

Table 2. (Continued).

Farm	Piglet isolates				No. of piglets with the same serotype in MLN-FEC	Sow fecal isolates	
	FEC		MLN			Serotype	No. (%)
	Serotype	No. (%)	Serotype	No. (%)		Serotype	No. (%)
E	Bovismorbificans	14 (27.5)	Bovismorbificans	14 (24.6)	11	Anatum	7 (87.5)
	4,[5],12:i:-	13 (25.5)	4,[5],12:i:-	12 (21.1)	9	Kapemba	1 (12.5)
	Anatum	9 (17.6)	Anatum	12 (21.1)	9		
	Derby	5 (9.8)	Derby	7 (12.3)	3		
	Ohio	3 (5.9)	Ohio	3 (5.3)	3		
	Panama	3 (5.9)	Panama	6 (10.5)	1		
	Infantis	2 (3.9)	Infantis	2 (3.6)	1		
	Rissen	1 (2)	London	1 (1.8)			
	Typhimurium	1 (2)					
Total		175		178	91		47

FEC: fecal content, MLN: Mesenteric lymph nodes.

Table 3. Association between *Salmonella* infection and *Salmonella* shedding in weaning piglets by mixed logistic regression analysis*.

	No. of piglets	No (%) of FEC + piglets	Logistic regression parameters		
			OR	95%CI(OR)	P
MLN					
Negative	320	53 (16.6)	1		
Positive	175	125 (71.4)	10.27	6.31, 16.86	<0.001
Season					
Winter	176	99 (56.3)	1		
Spring	222	48 (21.6)	0.35	0.21, 0.58	<0.001
Summer	97	28 (28.9)	0.38	0.19, 0.75	0.006

*Farm used as grouping factor.

FEC: fecal content; MLN: Mesenteric lymph nodes; OR: *Odds Ratio*.

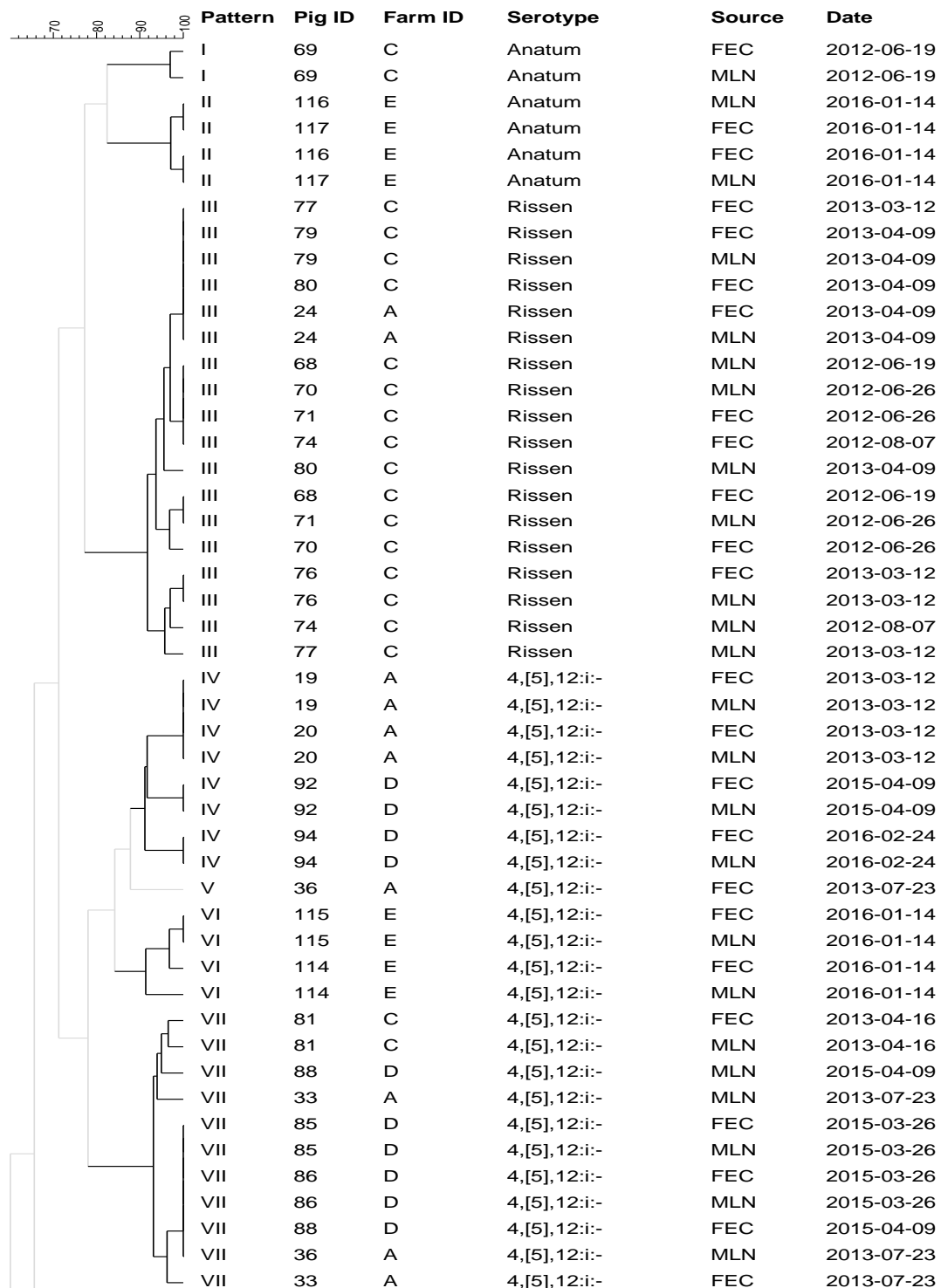
Table 4. Results for *Salmonella* isolation* and *Salmonella* seroprevalence** in weaned sows from 5 farms.

Farm	No. of fecal samples	No. of + fecal samples (%)	No. of serum samples (%)	Seroprevalence (%)
A	40	16 (40)	144	82 (56.9)
B	40	9 (22.5)	134	115 (85.8)
C	40	13 (32.5)	134	98 (73.1)
D	47	1 (2.1)	158	129 (81.6)
E	47	8 (17)	116	70 (60.3)
Total	214	47 (21.9)	686	494 (72)

*ISO 6579:2002/Amd 1:2007

**Cut-off value OD%≥40% (Herdcheck Swine *Salmonella* ELISA test, IDEXX Laboratories, US)

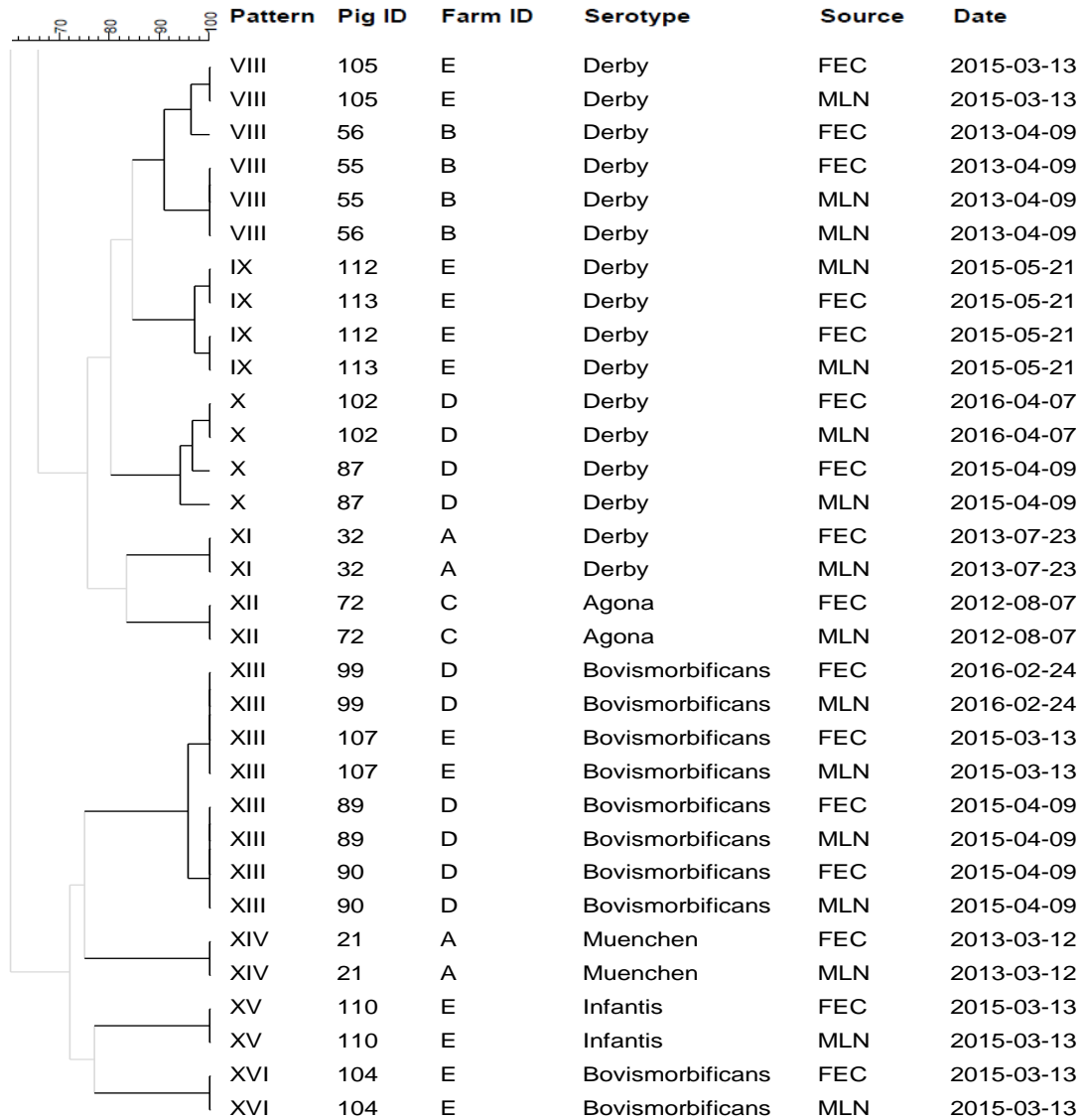
Figure 1. Dendrogram showing PFGE patterns* for 80 *Salmonella* isolates from 40 piglets.



*≥90% homology

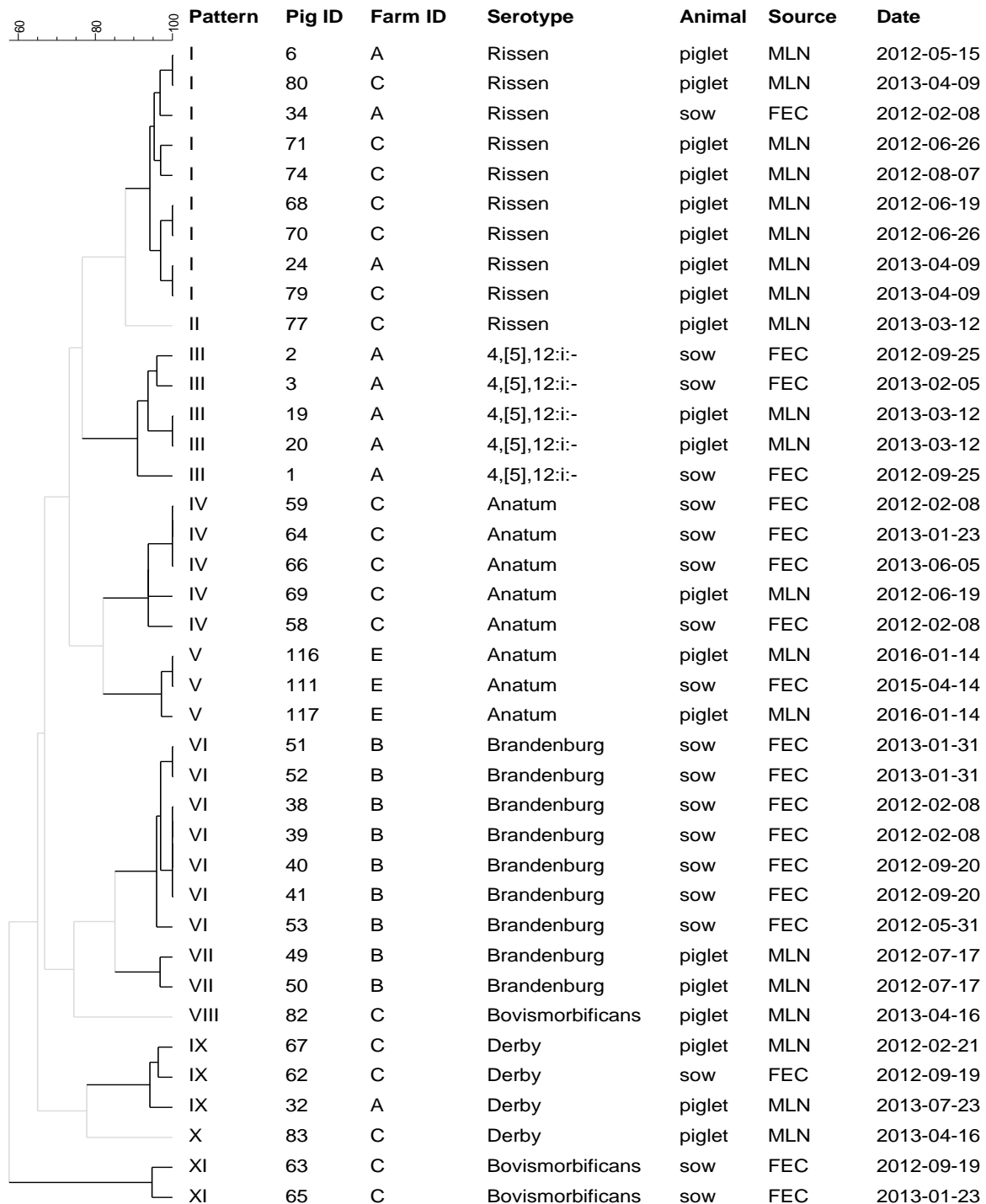
FEC: fecal content, MLN: Mesenteric lymph nodes

Figure 1. (Continued).



FEC: fecal content, MLN: Mesenteric lymph nodes

Figure 2. Dendrogram showing PFGE patterns* for 19 *Salmonella* isolates from sows and 20 from piglets.



*≥90% homology

FEC: fecal sample, MLN: Mesenteric lymph nodes

V. CONSIDERACIONES FINALES

El sector porcino es el primer sector ganadero del país (supuso el 36,8% de la Producción Final Ganadera y el 14,4% de la Producción Final Agraria en el año 2017) (MAPAMA, 2018b). Además de contribuir significativamente a la riqueza económica del sector primario en España, el ganado porcino potencia enormemente la industria transformadora agroalimentaria con productos de calidad, actuando de esta manera como importante elemento vertebrador del desarrollo rural y como factor potenciador del asentamiento de la población. Además, España se sitúa en el 4º lugar en el ranking mundial de la producción porcina, solo por detrás de China, Estados Unidos y Alemania, siendo el segundo exportador de carne de porcino de la UE. Así, para el mantenimiento de nuestro sector, cada vez somos más dependientes de la demanda de carne de porcino que exista en el extranjero.

La salmonelosis es un problema de Salud Pública que presenta una conexión directa con el ganado porcino. Numerosos países, muchos exportadores de carne de cerdo, han hecho esfuerzos, con más o menos éxito, para controlar esta infección en el ganado porcino. Si España quiere ser competitiva y mantener sus niveles de exportaciones, no solo debe ser capaz de producir carne de una forma más eficiente y sostenible, también tendrá que garantizar su seguridad. Por ello, el control de la infección por *Salmonella* en esta especie animal debería ser un objetivo prioritario. Para ello, es necesario conocer en profundidad la epidemiología de *Salmonella* dentro de las explotaciones porcinas con el fin de aplicar medidas preventivas eficaces y reducir la transmisión de la bacteria a lo largo de la cadena alimentaria.

La llegada de cerdos excretando *Salmonella* al matadero es el principal factor de riesgo de contaminación de las canales (Beloeil *et al.*, 2004; Argüello *et al.*, 2013a; Swart *et al.*, 2016). Debido a ello, conocer cómo influye el estatus de infección de *Salmonella* en los cerdos durante la fase de cebo parecía clave para poder intentar reducir la excreción de *Salmonella* en el matadero. Esto fue posible gracias al estudio de la dinámica natural de la infección de *Salmonella* llevado a cabo en un pequeño cebadero comercial de cerdos, dando como resultado las dos primeras Publicaciones de esta Tesis Doctoral.

Los cerdos seropositivos durante la fase de cebo e infectados a nivel de NLM en el momento del sacrificio presentaron un mayor riesgo de excreción de *Salmonella* en el matadero (**Publicación I**). Además, los cerdos que excretaban *Salmonella* en el matadero seroconvertían antes y con valores más elevados durante el cebo que los cerdos que no llegaron a excretar *Salmonella*. Esto sugiere que la infección en la explotación juega un papel activo en la excreción en el matadero. La existencia de cerdos seronegativos a *Salmonella* durante el cebo y no infectados a nivel de NLM pero que acabaron excretando *Salmonella* durante el sacrificio (el

26,1%), afianzaba la idea de que la aplicación correcta de las medidas de higiene en el transporte a matadero y durante el sacrificio será fundamental para evitar infecciones en animales sanos.

A pesar de que España aparece en los informes de la EFSA como país líder en prevalencia de *Salmonella* tanto en cerdos de cebo como en cerdas reproductoras (EFSA, 2008; EFSA, 2009), hasta el momento no ha llevado a cabo ningún programa nacional de control de *Salmonella* en las explotaciones porcinas. Esto contrasta con lo sucedido en otros países de la UE afectados por la salmonelosis porcina, como Dinamarca, Alemania y Holanda, que sí implantaron un programa oficial de control de *Salmonella* y que son también grandes productores de porcino a nivel europeo y competidores en el mercado de la carne de porcino. Con el fin de no perder competitividad en el mercado exterior, sería recomendable que España implantara un programa nacional de control de *Salmonella* asociada al ganado porcino en los próximos años, tal como ha sucedido en otros países.

Sin embargo, hasta ahora los programas nacionales implantados en algunos países de la UE no han sido todo lo satisfactorios que se esperaba. En general, no han conseguido el objetivo final de reducir los casos de salmonelosis humana atribuidos al cerdo, excepto en los países escandinavos, que presentan unas características difíciles de extrapolar a nuestro país. Son varios los motivos que pueden haber intervenido en este fracaso y España debería aprender de los errores de los países que ya iniciaron estos programas.

En la **Publicación II**, y a raíz de los resultados de la Publicación I, se plantea un nuevo enfoque en el que el objetivo del programa sería la reducción de la excreción en los animales que llegan al matadero. Para ello se determinó la capacidad de la serología en granja como herramienta para predecir la excreción en los cerdos que llegan a matadero. Aunque la utilización de la serología a los 30 días de cebo no fue capaz de predecir la excreción en el matadero, sí se observó una correlación positiva significativa entre la serología a los 60 y 90 días de engorde, o justo antes del sacrificio, y la excreción de *Salmonella* al sacrificio. Una vez determinado el riesgo potencial de excreción de *Salmonella* para un lote de cerdos, las medidas de control tanto en la granja como en el matadero podrían programarse con tiempo suficiente, lo que debería redundar en un menor riesgo de contaminación de las canales. A raíz de los resultados obtenidos, el muestreo representativo de animales en la granja podría hacerse en cualquier momento después de los 60 días de engorde y hasta 2-3 días antes del sacrificio, pero habrá que tener en cuenta el tiempo necesario para reaccionar y establecer medidas de mitigación con antelación suficiente ante una predicción de excreción alta de los animales que vayan a ser sacrificados. Consideramos que realizar la serología el día 90 de cebo permitiría

disponer de tiempo suficiente (aproximadamente un mes) para llevar a cabo las actuaciones más convenientes.

El control de la infección durante la fase de cebo sería fundamental, al estar relacionada con la probabilidad de excreción de la bacteria en el matadero. Las medidas de higiene y bioseguridad son una de las principales estrategias de control frente a *Salmonella*. Sin embargo, la aplicación correcta y constante de este tipo de medidas en la explotación y en el matadero es complicada, por lo que deben venir acompañadas de estrategias de control adicionales. La vacunación frente a *Salmonella* en porcino podría ser una alternativa prometedora, pero todavía no se han obtenido buenos resultados de eficacia en la reducción de la excreción e infección durante el cebo, siendo necesarios más estudios *in vivo*. El uso de antibióticos vía pienso y/o agua ha sido restringido debido al alarmante desarrollo de resistencias antimicrobianas, por lo que es necesario la búsqueda de alternativas eficaces para el control de la *Salmonella*.

En esta Tesis Doctoral se estudió la administración en el pienso durante toda la fase de cebo de un ácido orgánico, el butirato sódico, que ha demostrado propiedades antimicrobianas *in vitro* frente a *Salmonella*, pero con resultados de eficacia variables en estudios *in vivo*. Se plantearon dos estudios *in vivo* con el objetivo de incrementar la información disponible sobre el uso de este aditivo en el control de *Salmonella*. La evaluación de la eficacia de este ácido orgánico en el control de la infección y la excreción de *Salmonella* durante el periodo de cebo se llevó a cabo tras la administración del butirato sódico a una misma concentración de 3 kg/t de pienso, pero con dos formas distintas de protección del aditivo, para evitar la absorción del butirato sódico en las partes proximales del intestino (Kotunia *et al.*, 2004). En el primer ensayo (**Publicación III**) la protección del aditivo se basó en una grasa vegetal y en el segundo ensayo (**Publicación IV**) en una encapsulación con una fórmula de ácidos grasos destilados de coco.

En los animales tratados con el butirato sódico se observó una reducción significativa de la excreción de *Salmonella* a final de cebo y en el matadero, junto con una reducción también significativa de cerdos infectados y de los niveles de seroprevalencia a lo largo del cebo. A la vista de estos resultados positivos, la administración en el pienso de butirato sódico protegido puede ser una alternativa eficaz a los antibióticos para el control de la *Salmonella* durante el cebo, con el objetivo final de reducir la contaminación de las canales. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que determinen si este producto sería eficaz si se utiliza durante un periodo menor de tiempo y al final del cebo, para complementar así el posible programa de control descrito anteriormente y optimizar esta estrategia de control.

Otro aspecto que nos interesaba, y que está poco recogido en la literatura científica sobre salmonelosis porcina, era el papel del lechón lactante en la epidemiología de esta infección en condiciones de campo (Wales *et al.*, 2011). Estos estudios son difíciles debido a su elevado coste, dado el necesario sacrificio de un gran número de animales si se quiere conocer de forma precisa el estado de infección de los mismos. Por esta razón, hasta la fecha, los trabajos publicados en lechones solo han estudiado la prevalencia de excreción a través del uso de técnicas de diagnóstico con baja sensibilidad, como los hisopos rectales. En España, el sacrificio rutinario de lechones destetados sanos de 4 semanas de vida, para la producción de cochinillo asado destinado al consumo humano, nos ofrecía la ventaja de poder llevar a cabo un estudio más exhaustivo de la infección por *Salmonella* a estas edades. Se aprovechó la disponibilidad del paquete digestivo completo de los lechones sacrificados para obtener muestras de contenido fecal, NLM y músculo diafragmático, siendo así el primer trabajo de investigación que permite el estudio de la infección por *Salmonella* en lechones destetados (**Publicación V**).

Los resultados fueron hasta cierto punto sorprendentes, ya que se detectó una elevada prevalencia de excreción (35,4%) y de infección (36%) en los lechones, muy por encima de la detectada en los estudios realizados con anterioridad (0-9%). Este trabajo evidencia sin lugar a dudas que los lechones de menos de 4 semanas de vida son muy susceptibles a la infección subclínica por *Salmonella*. Además, se observó un posible efecto protector del calostro frente a la infección, al encontrar valores serológicos significativamente más elevados en lechones no infectados que en los lechones infectados, por lo que la ingestión de calostro en las primeras horas de vida jugaría un papel fundamental en la protección frente a la infección durante la lactación. Este trabajo también permitió observar que la mayoría de los serotipos (89%) aislados de muestras fecales de cerdas reproductoras se detectaban también en los lechones, y que el 75% de los aislados de lechones analizados por PFGE estaban relacionados genéticamente con los aislados de las cerdas. En consecuencia, el estudio puso en evidencia la circulación de *Salmonella* entre cerdas adultas de la explotación y los lechones, confirmando la transmisión de la infección bien a través de las heces de las cerdas o de la contaminación residual en las salas de maternidad.

En definitiva, se demuestra que las fases de lactación y destete pueden jugar un papel fundamental en el inicio de la diseminación de *Salmonella* en la explotación y que, hasta el momento, son etapas que han pasado desapercibidas en los planes de control de *Salmonella*. La reducción del uso de antibióticos, especialmente en la etapa post destete (transición), abrirá seguramente un nuevo escenario para las infecciones que ocurren en estas fases iniciales al que habrá que darle respuesta.

Desde el punto de vista del control de la infección en los lechones, además de garantizar la ingestión del calostro, serán necesarias estrategias para reducir la excreción de *Salmonella* en las cerdas y disminuir así las posibilidades de exposición de los lechones. La vacunación frente a *Salmonella* en las cerdas y/o lechones lactantes (de la Cruz *et al.*, 2017) junto con el empleo de estrategias de alimentación en las cerdas son dos ejemplos de posibles actuaciones que podrían llevarse a cabo para el control de la infección. Estas últimas ya han mostrado su utilidad frente a *Salmonella* en otras etapas del ciclo productivo del cerdo (Lynch *et al.*, 2017).

VI. CONCLUSIONES

1. Se observó una relación positiva entre la seropositividad a *Salmonella* en la explotación y la excreción de la bacteria en el matadero. Los cerdos seropositivos en la explotación presentaron una mayor probabilidad de excretar *Salmonella* en el matadero que los seronegativos. Esto sugiere que el control de la infección en la explotación permitiría reducir el riesgo de contaminación por *Salmonella* en los mataderos.
2. Un porcentaje significativo de los cerdos seronegativos, y no infectados por *Salmonella* a nivel de nódulos linfáticos mesentéricos, excretó *Salmonella* en el matadero. Ésto se asociaría con infecciones ocurridas durante el transporte y/o alojamiento en los corrales de espera del mismo. Por lo tanto, se recomiendan tanto estrategias para reducir la excreción de los animales infectados que llegan al matadero, como el mantenimiento de estrictas medidas de higiene en los camiones y los corrales para reducir la probabilidad de infección de los cerdos no infectados.
3. Los diferentes planes nacionales de control de la salmonelosis porcina implantados en varios países europeos se basaron en el programa danés de caracterización de riesgo en las explotaciones. Sin embargo, a diferencia de los países escandinavos, no parece que hayan obtenido resultados satisfactorios en cuanto a la reducción de la infección en los cerdos o en el número de casos de salmonelosis humana atribuidos al consumo de carne de cerdo. Por lo tanto, España no debería copiar este modelo, sino plantear un nuevo enfoque de acuerdo con las condiciones de producción españolas.
4. La serología en granja podría ser una herramienta eficaz para predecir la probabilidad de excreción de *Salmonella* en los cerdos que llegan al matadero, lo que podría utilizarse para llevar a cabo estrategias de control con antelación para reducir el riesgo de excreción de la bacteria al sacrificio y prevenir la contaminación por *Salmonella* de las canales en el matadero. Sin embargo, es necesario un estudio a gran escala que confirme el potencial de esta nueva estrategia.
5. La administración de butirato sódico protegido en cerdos durante todo el periodo de cebo a una concentración de 3 kg/t de pienso disminuyó los niveles de infección y de excreción de *Salmonella* en el matadero y redujo los niveles serológicos frente a *Salmonella* hasta el sacrificio. Queda pendiente valorar su eficacia durante periodos más cortos para determinar el potencial de esta estrategia de alimentación dentro de un programa de control como el sugerido en este trabajo de Tesis Doctoral.

6. Los niveles de prevalencia de infección y excreción de *Salmonella* en los lechones destetados fueron muy superiores a lo esperado según estudios previos, evidenciando que los lechones pueden infectarse subclínicamente durante la lactación y actuar como portadores de la infección en la granja.
7. Las cerdas son posiblemente uno de los principales orígenes de la infección por *Salmonella* en los lechones en lactación, ya que se detectaron aislados de *Salmonella* procedentes de cerdas que estaban genéticamente relacionados con los aislados encontrados en los lechones destetados.
8. Los lechones destetados no infectados por *Salmonella* presentaron unos valores serológicos frente a *Salmonella* significativamente más elevados que los lechones infectados. Por esta razón, aumentar la calidad y la ingestión de calostro podría ayudar en la prevención de la infección durante la lactación.

VI. CONCLUSIONS

1. A positive relationship was observed between on-farm *Salmonella* seropositivity and *Salmonella* shedding at the slaughterhouse. Seropositive pigs were more likely to shed *Salmonella* at the slaughterhouse than the seronegative pigs. This finding suggests that the control of the infection at the farm would reduce the risk of *Salmonella* contamination at the slaughterhouse.
2. A significant percentage of *Salmonella* seronegative pigs, that were also *Salmonella* negative on mesenteric lymph nodes, ended up shedding *Salmonella* at the slaughterhouse. This was likely due to infections occurring during transport and/or lairage. Therefore, strategies to reduce *Salmonella* shedding in pigs arriving to the slaughterhouse are recommended along with strict hygiene measures in both trucks and slaughter pens to reduce the risk of *Salmonella* infection.
3. Different national swine salmonellosis control programmes implemented in several European countries were based on the Danish on-farm risk characterization program. However, none of the non-Scandinavian countries has reported of any significant success on *Salmonella* infection reduction in fattening pigs or the number of human cases attributable to pigs or pork. Therefore, Spain should not copy this model, but propose a new approach in accordance with the Spanish pig production conditions.
4. On-farm serology could be an effective tool to predict the probability of *Salmonella* shedding in pigs arriving to the slaughterhouse, which could be used to carry out prompt control interventions to reduce the risk of *Salmonella* shedding at slaughter and thus prevent carcasses from *Salmonella* contamination. However, a large-scale study is required to confirm the potential of this approach.
5. Protected sodium butyrate administered to pigs during the whole fattening period at a concentration of 3 kg/T of feed reduced *Salmonella* infection and shedding at the slaughterhouse, and also decreased *Salmonella*-ELISA values. It is required to assess its efficacy when used during shorter periods to determine the potential of this feeding strategy within a control programme like the one suggested in this Doctoral Thesis.
6. The overall prevalence of *Salmonella* infection and shedding in weaned piglets were higher than expected according to previous studies, showing that piglets could be subclinically infected during lactation and act as important carriers of the infection in the farm.

7. Sows are likely one of the main sources of *Salmonella*-infection in suckling piglets, since *Salmonella* isolates from sows were genetically related to *Salmonella* isolates from weaned piglets.
8. *Salmonella* non-infected weaned piglets showed significantly higher ELISA values than infected weaned piglets. Therefore, improving both colostrum quality and its intake by piglets may help to prevent *Salmonella* infection during lactation.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alban L, Stege H, Dahl J (2002) The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. *Prev Vet Med* 53(1-2):133-146.
- Alban L, Stärk KD (2005) Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? *Prev Vet Med* 68(1):63-79.
- Alban L, Barfod K, Petersen JV, Dahl J, Ajufo JC, Sandø G, Krog HH, Aabo S (2010) Description of extended pre-harvest pig *Salmonella* surveillance-and-control programme and its estimated effect on food safety related to pork. *Zoonoses Public Health* 57 (Suppl 1):6-15.
- Alban L, Baptista FM, Møgelmoose V, Sørensen LL, Christensen H, Aabo S, Dahl J (2012) *Salmonella* surveillance and control for finisher pigs and pork in Denmark — A case study. *Food Res Int* 45(2):656-665.
- Alt K, Simon S, Helmeke C, Kohlstock C, Prager R, Tietze E, Rabsch W, Karagiannis I, Werber D, Frank C, Fruth A (2015) Outbreak of uncommon O4 non-agglutinating *Salmonella* typhimurium linked to minced pork, Saxony-Anhalt, Germany, January to April 2013. *PLoS One* 10(6):e0128349.
- Álvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, Hill C (2011) *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiol* 157(Pt 12):3268-3281.
- Andrés-Barranco S, Vico JP, Garrido V, Samper S, Herrera-León S, de Frutos C, Mainar-Jaime RC (2014) Role of wild bird and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. *Foodborne Pathog Dis* 11(9):689-697.
- Andrés-Barranco S, Vico JP, Grilló MJ, Mainar-Jaime RC (2015) Reduction of subclinical *Salmonella* infection in fattening pigs after dietary supplementation with a β -galactomannan oligosaccharide. *J Appl Microbiol* 118(2):284-294.
- Andrés VM, Davies RH (2015) Biosecurity Measures to Control *Salmonella* and Other Infectious Agents in Pig Farms: A Review. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 14(4):317-335.
- Anónimo (1992) Directiva 92/117/CEE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos de origen animal, a fin de evitar el brote de infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31992L0117&from=ES> [Fecha de consulta: 1 de marzo 2019].
- Anónimo (2001) Annual Report on Zoonoses in Denmark 2000. Ministry of Food, Agriculture and Fisheries, Copenhagen, Denmark. Disponible en: www.food.dtu.dk/english/-/media/Institutter/Foedevareinstituttet/Publikationer/Pub-2001/annual_report_zoonoses_2000.ashx?la=da&hash=A560E9AEB9DA09F623B4BBCEE3C91AF925E4A953 [Fecha de consulta: 1 de marzo 2019].

Anónimo (2003a) DIRECTIVA 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0099&from=ES> [Fecha de consulta: 1 de marzo 2019].

Anónimo (2003b) Reglamento (CE) nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R2160&from=ES> [Fecha de consulta: 1 de marzo 2019].

Anónimo (2003c) Annual Report on Zoonoses in Denmark 2002. Ministry of Food, Agriculture and Fisheries, Copenhagen, Denmark. Disponible en: www.food.dtu.dk/english/-/media/Institutter/Foedevareinstituttet/Publikationer/Pub-2003/Annual-Report-on-Zoonoses-in-Denmark-2002.ashx?la=da&hash=B77BBE5C6A2D3ED0AAC27E259C5DE65907C12EF9 [Fecha de consulta: 1 de marzo 2019].

Anónimo (2005) Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=ES> [Fecha de consulta: 1 de marzo 2019].

Anónimo (2007) ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples from the primary production stage. International Organization for Standardization. Disponible en: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=42109 [Fecha de consulta: 1 marzo 2019].

Anónimo (2010) Annual Report on Zoonoses in Denmark 2009. National Food Institute, Technical University of Denmark. Disponible en: www.food.dtu.dk/english/-/media/Institutter/Foedevareinstituttet/Publikationer/Pub-2010/Annual-Report-on-Zoonoses-in-Denmark-2009.ashx?la=da&hash=09CB280E282D9DCF17D1A8BDC2955313645A8A77 [Fecha de consulta: 20 de marzo 2019].

Anónimo (2012) UK: New direction for Zoonoses National Control Programme (ZNCP). Disponible en: <https://www.pigprogress.net/Health-Diseases/Health/2012/6/UK-New-direction-for-Zoonoses-National-Control-Programme-ZNCP-PP008961W/> [Fecha de consulta: 15 marzo 2019].

Anónimo (2014) Commission Regulation (EU) Nº 217/2014 of 7 March 2014 amending Regulation (EC) Nº 2073/2005 as regards *Salmonella* in pig carcasses. Disponible en:

<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/2a5f9172-a699-11e3-8438-01aa75ed71a1/language-en> [Fecha de consulta: 1 de abril 2019].

Anónimo (2015a) Commission notice: Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine. Official Journal of European Union of 11 September, C299/7-C299/26.

Anónimo (2015b) Presentado un nuevo Programa de control de *Salmonella* en porcino. Disponible en: <https://www.3tres3.com/ultima-hora/presentado-un-nuevo-programa-de-control-de-Salmonella-en-porc-36010/> [Fecha de consulta: 20 marzo 2019].

Anónimo (2017) Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2017). International Organization for Standardization. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/56712.html> [Fecha de consulta: 1 marzo 2019].

Anónimo (2018) Annual Report on Zoonoses in Denmark 2017. National Food Institute, Technical University of Denmark. Disponible en: www.food.dtu.dk/english/-/media/Institutter/Foedevareinstituttet/Publikationer/Pub-2018/Rapport-Annual-Report-on-Zoonoses-2017.ashx?la=da&hash=4D9E579C2B146B6DDA569A12912652518AA0590F [Fecha de consulta: 1 de abril 2019].

Anónimo (2019) Alemania: sacrificio de cerdos en 2018. Web 3tres3. Disponible en: <https://www.3tres3.com/ultima-hora/alemania-sacrificio-de-cerdos-en-2018-40661/> [Fecha de consulta: 1 marzo 2019].

Argüello H, Alvarez-Ordoñez A, Carvajal A, Rubio P, Prieto M (2013a) Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. J Food Prot 76(5):899-911.

Argüello H, Carvajal A, Naharro G, Rubio P (2013b) Evaluation of protection conferred by a *Salmonella* Typhimurium inactivated vaccine in *Salmonella*-infected finishing pig farms. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 36(5):489-498.

Argüello H (2013c) Salmonelosis porcina en España: factores de riesgo en reproductores, estrategias de control en cerdos de cebo y la importancia del sacrificio. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Tesis Doctoral.

Argüello H, Manzanilla EG, Lynch H, Walia K, Leonard FC, Egan J, Duffy G, Gardiner GE, Lawlor PG (2018) Surveillance Data Highlights Feed Form, Biosecurity, and Disease Control as Significant Factors Associated with *Salmonella* Infection on Farrow-to-Finish Pig Farms. Front Microbiol 9:187.

Arnedo-Pena A, Sabater-Vidal S, Herrera-León S, Bellido-Blasco JB, Silvestre-Silvestre E, Meseguer-Ferrer N, Yague-Muñoz A, Gil-Fortuño M, Romeu-García A, Moreno-Muñoz R (2016) An outbreak of monophasic and biphasic *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Derby

associated with the consumption of dried porksausage in Castellon (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 34(9):544-550.

Arnedo-Pena A, Vivas-Fornas I, Meseguer-Ferrer N, Tirado-Balaguer MD, Yagüe-Muñoz A, Herrera-León S, Sabater-Vidal S, Romeu-García MÁ, Vizcaino Batllés A, Bellido-Blasco JB, Moreno-Muñoz R (2018) Comparison of sporadic cases of *Salmonella* Typhimurium with other *Salmonella* serotypes in Castellon (Spain): case-case study. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 36(8):478-483.

Arnedo-Pena A, Vivas-Fornas I, Meseguer-Ferrer N, Tirado-Balaguer MD, Yagüe-Muñoz A, Herrera-León S, Herrera-León L, Sabater-Vidal S, Romeu-García MA, Vizcaino-Batlles A, Bellido-Blasco JB, Moreno-Muñoz R (2019) Risk factors of sporadic of *Salmonella* and *Salmonella* Typhimurium infections in Castellon (Spain): a matched case-control study. *Rev Enf Emerg* 18(1):7-16.

Arnold ME, Gosling RJ, Martelli F, Mueller-Doblies D, Davies RH (2015) Evaluation of the sensitivity of faecal sampling for detection of monophasic *Salmonella* Typhimurium and other *Salmonella* in cattle and pigs. *Epidemiol Infect* 143(8):1681-1691.

Bahnson PB, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR, Mateus-Pinilla NE (2006) Herd-level risk factors for *Salmonella* enterica subsp. enterica in U.S. market pigs. *Prev Vet Med* 76(3-4):249-262.

Ball MEE, Magowan E, Taylor M, Bagdonaite G, Madden R (2011) A review of current knowledge on *Salmonella* control on-farm and within the processing plant relevant to the Northern Ireland pig industry. Disponible en: <https://www.afbini.gov.uk/sites/afbini.gov.uk/files/publications/%5Bcurrent-domain%3Amachine-name%5D/Salmonella%20control.pdf> [Fecha de consulta: 1 de abril 2019].

Ballesté-Despierre C, Vila-Estapé J (2016) Why are we still detecting food-related *Salmonella* outbreaks in Spain? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 34(9):541-543.

Barba-Vidal E, Martín-Orúe SM, Castillejos L (2018) Review: Are we using probiotics correctly in post-weaning piglets? *Animal* 12(12):2489-2498.

Barber DA, Bahnson PB, Isaacson R, Jones CJ, Weigel RM (2002) Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems. *J Food Prot* 65(12):1861-1888.

Beloeil PA, Chauvin C, Proux K, Rose N, Queguiner S, Eveno E, Houdayer C, Rose V, Fravallo P, Madec F (2003) Longitudinal serological responses to *Salmonella* enterica of growing pigs in a subclinically infected herd. *Prev Vet Med* 60(3):207-226.

Beloeil PA, Chauvin C, Proux K, Madec F, Fravallo P, Alioum A (2004) Impact of the *Salmonella* status of market-age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter. *Vet Res* 35(5):513-530.

Beloeil PA, Chauvin C, Proux K, Fablet C, Madec F, Alioum A (2007) Risk factors for *Salmonella* seroconversion of fattening pigs in farrow-to-finish herds. *Vet Res* 38(6):835-848.

Berends BR, Urlings HA, Snijders JM, Van Knapen F (1996) Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int J Food Microbiol* 30(1-2):37-53.

Blaha T (2003) Implementing a *Salmonella* Monitoring Programme for Pork in Germany. En Proceedings del 5th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborn Pathogens in Pork (Safe Pork). Heraklion-Crete, Greece, 1-4 de septiembre, p. 200-202.

Blaha T (2004) The present state of the German QS *Salmonella* monitoring and reduction programme. *Dtsch Tierärztl Wschr* 111(8):324-326.

Blaha T (2017) The German *Salmonella* serological monitoring programme. Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/el-programa-aleman-de-monitorizacion-serologica-de-Salmonella_37930/ [Fecha de consulta: 25 de febrero de 2019].

Bonardi S (2017) *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol Infect* 145(8):1513-1526.

Bone A, Noel H, Le Hello S, Pihier N, Danan C, Raguenaud ME, Salah S, Bellali H, Vaillant V, Weill FX, Jourdan-da Silva N (2010) Nationwide outbreak of *Salmonella* enterica serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2011. *Euro Surveill* 15(24). pii: 19592.

Borowsky L, Corção G, Cardoso M (2009) Mannanoglycosaccharide agglutination by *Salmonella* enterica strains isolated from carrier pigs. *Braz J Microbiol* 40(3):458-464.

Boughton C, Egan J, Kelly G, Markey B, Leonard N (2007) Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella* typhimurium. *Foodborne Pathog Dis* 4(1):33-40.

Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F (2008) Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet Microbiol* 130(1-2):1-19.

Brossé C (2015) *Salmonella* in pigs in Belgium. En 2nd International *Salmonella* Symposium IDT Biologika - 12 Years of Directive 2003/99/EC: How far have we really come? Wörlitz, Germany, 23-25 May.

Calveyra JC, Nogueira MG, Kich JD, Biesus LL, Vizzotto R, Berno L, Coldebella A, Lopes L, Morés N, Lima GJ, Cardoso M (2012) Effect of organic acids and mannanoglycosaccharide on excretion of *Salmonella* typhimurium in experimentally infected growing pigs. *Res Vet Sci* 93(1):46-47.

Campos J, Mourão J, Peixe L, Antunes P (2019) Non-typhoidal *Salmonella* in the Pig Production Chain: A Comprehensive Analysis of Its Impact on Human Health. *Pathogens* 8(1).pii:E19.

Canibe N, Jensen B (2012) Fermented liquid feed – Microbial and nutritional aspects and impact on enteric disease in pigs. *Anim Feed Sci Technol* 173 (1-2):17-40.

Cardona N, Sánchez M (2005) Evaluación de la capacidad de invasion de serovariedades de *Salmonella* enterica a células Hep-2. *CES Med* 19(2):7-17.

Carlson SA, Barnhill AE, Griffith RW (2012) Salmonellosis, p. 882. En JJ Zimmerman, L Karriker, A Ramirez, K Schwartz, G Stevenson (ed) *Disease of Swine*, 10th. ED. John Wiley & Sons, Inc.

Casal J, De Manuel A, Mateu E, Martín M (2007) Biosecurity measures on swine farms in Spain: perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures. *Prev Vet Med* 82(1-2):138-150.

CDC (2013) Pulsed-fields Gel Electrophoresis (PFGE). Disponible en: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html> [Fecha de consulta: 15 febrero 2019].

Correia-Gomes C, Mendonça D, Vieira-Pinto M, Niza-Ribeiro J (2013) Risk factors for *Salmonella* spp in Portuguese breeding pigs using multilevel analysis. *Prev Vet Med* 108(2-3):159-166.

Cowden JM, O'Mahony M, Bartlett CL, Rana B, Smyth B, Lynch D, Tillett H, Ward L, Roberts D, Gilbert RJ, Baird-Parker AC, Kilsby DC (1989) A national outbreak of *Salmonella typhimurium* DT 124 caused by contaminated salami sticks. *Epidemiol Infect* 103(2):219-225.

Dahl J (2011) Association between serological *salmonella* monitoring in breeding herds and meat-juice prevalence in sow herds with production of finishers. En *Proceedings del 9th International Conference on the Epidemiology and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork*. Maastricht, The Netherlands, 19-22 de junio, p. 174-177.

Daniels MJ, Hutchings MR, Greig A (2003) The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol Infect* 130(3):561-568.

Davies PR, Morrow WE, Jones FT, Deen J, Fedorka-Cray PJ, Harris IT (1997) Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Epidemiol Infect* 119(2):237-244.

Davies PR, Funk JA, WE Morgan-Morrow (2000) Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *J Swine Health Prod* 8(1):25-29.

De Busser EV, Dewulf J, Nollet N, Houf K, Schwarzer K, De Sadeleer L, De Zutter L, Maes D (2009) Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to slaughter on

Salmonella shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses. Zoonoses Public Health 56(3):129-136.

De Frutos M, López-Urrutia L, Berbel C, Allue M, Herrera S, Azcona JM, Beristaín X, Aznar E, Albert M, Ruiz C, Eiros JM (2018) Brote de *Salmonella* Typhimurium monofásica asociada al consumo de carne asada de cerdo. Rev Esp Quimioter 31(2):156-159.

De la Cruz ML, Conrado I, Nault A, Pérez A, Domínguez L, Álvarez J (2017) Vaccination as a control strategy against *Salmonella* infection in pigs: A systematic review and meta-analysis of the literature. Res Vet Sci 114:86-94.

De Ridder L (2014) Optimization of the control of *Salmonella* infections in pigs. Facultad de Veterinaria. Universidad de Gante, Bélgica. Tesis Doctoral.

Delzenne NM (2003) Oligosaccharides: state of the art. Proceedings of the Nutrition Society 62:177-182.

Diard M, Sellin ME, Dolowschiak T, Arnoldini M, Ackermann M, Hardt WD (2014) Antibiotic treatment selects for cooperative virulence of *Salmonella* typhimurium. Curr Biol 24(17):2000-2005.

Edel W, van Schothorst M, Guinée PA, Kampelmacher EH (1970) Effect of feeding pellets on the prevention and sanitation of *Salmonella* infections in fattening pigs. Zentralbl Veterinarmed B 17(7):730-738.

EFSA (2006) Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on “Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production”. EFSA J 341:1-131.

EFSA (2008) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A. EFSA J 135:1-111.

EFSA (2009) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J 7(12):1377.

EFSA (2010) Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk Assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs. EFSA J 8(4):1547.

EFSA (2011) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 – Part B: factors associated with *Salmonella* pen positivity. EFSA J 9(7):2329.

EFSA (2017a) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2016. EFSA Journal 15(12):5077.

EFSA (2017b) Trend and sources of zoonoses and zoonotic agents in foodstuffs, animals and feedingstuffs in Spain. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene->

[ganadera/informefuentesytendenciaszoonosis2017espana_3_tcm30-500049.pdf](#) [Fecha de consulta: 15 de marzo 2019].

EFSA (2018) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2017. EFSA Journal 16(12):5500.

EMA (European Medicines Agency) (2016) Updated Advice on the Use of Colistin Products in Animals Within the European Union: Development of Resistance and Possible Impact on Human and Animal Health. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/05/WC500207233.pdf [Fecha de consulta: 1 de febrero de 2019].

Emborg HD, Nielsen AC, Jensen PT, Nielsen JP, Mousing J (1997) The Danish *Salmonella* Surveillance Programme of slaughter pig herds. Epidemiol Sante Anim 31:32.

Eriksson E, Aspan A (2007) Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. BMC Vet Res 3:21.

EUROSTAT (2019) Production of meat: pigs. Disponible en: <https://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&init=1&language=en&pcode=tag00042&plugin=1> [Fecha de consulta: 5 marzo 2019].

FAO/WHO (2001) Informe de la Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Córdoba, Argentina, 1-4 de octubre de 2001. Disponible en: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf> [Fecha de consulta: 1 de febrero de 2019].

Farzan A, Friendship RM, Dewey CE, Warriner K, Poppe C, Klotins K (2006) Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. Prev Vet Med 73(4):241-254.

Farzan A, Friendship RM, Dewey CE (2007) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd. Epidemiol Infect 135(2):238-244.

Farzan A, Friendship RM, Dewey CE, Muckle AC, Gray JT, Funk J (2008) Distribution of *Salmonella* serovars and phage types on 80 Ontario swine farms in 2004. Can J Vet Res 72(1):1-6.

Fedorka-Cray P, Gray J, Clifford W (2000) *Salmonella* infections in Pigs, p. 191-208. En Wray C and Wray A (ed) *Salmonella* in domestic Animals, 1st. Ed. CABI International, Oxfordshire, UK.

Fraile L (2016) Aplicación práctica de antibióticos en producción porcina: Actualización de conceptos básicos, pros y contras. Disponible en:

https://www.3tres3.com/articulos/aplicacion-practica-de-antibioticos-en-produccion-porcina_36910/ [Fecha de consulta: 10 de maro 2019].

Fraser RW, Williams NT, Powell LF, Cook AJ (2010) Reducing *Campylobacter* and *Salmonella* infection: two studies of the economic cost and attitude to adoption of on-farm biosecurity measures. *Zoonoses Public Health* 57(7-8):e109-115.

Funk JA, Davies PR, Nichols MA (2000) The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella* enterica in swine feces. *J Vet Diagn Invest* 12(5):412-418.

Funk JA, Davies PR, Nichols MA (2001) Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet Microbiol* 83(1):45-60.

Funk JA, Harris IT, Davies PR (2005) Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of *Salmonella* enterica subsp. enterica prevalence in growing swine. *Vet Microbiol* 107(1-2):115-126.

Giaccone V, Catellani P, Alberghini L (2012) Food as cause of human salmonellosis, p. 47-72. En BSM Mahmoud (ed.), *Salmonella – A dangerous foodborne pathogen*. InTech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/Salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/food-as-cause-of-human-salmonellosis> [Fecha de consulta: 16 marzo 2019].

Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125(6):1401-1412.

Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17(2):259-275.

Gossner CM, van Cauteren D, Le Hello S, Weill FX, Terrien E, Tessier S, Janin C, Brisabois A, Dusch V, Vaillant V, Jourdan-da Silva N (2011) Nationwide outbreak of *Salmonella* enterica serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Euro Surveill* 17(5).pii: 20071.

Gotter V, Klein G, Koesters S, Kreienbrock L, Blaha T, Campe A (2012) Main risk factors for *Salmonella*-infections in pigs in north-western Germany. *Prev Vet Med* 106(3-4):301-317.

Gradassi M, Caminiti A, Galletti G, Santi A, Paternoster G, Tamba M, Zanoni M, Tagliabue S, Alborali GL, Trevisani M (2015) Suitability of a *Salmonella* control programme based on serology in slaughter heavy pigs. *Res Vet Sci* 101:154-60.

Griffin A, McSorley S (2010) Prolonged *Salmonella* persistence occurs in the Mesenteric Lymph Nodes of antibiotic treated mice. *J Immunology* 184(1):40.15.

Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A (2004) Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet Microbiol* 100(3-4):255-268.

Hallstrom K, McCormick BA (2011) *Salmonella* Interaction with and Passage through the Intestinal Mucosa: Through the Lens of the Organism. *Front Microbiol* 2(88):1-10.

Hanssen EJ, Swanenburg M, Maassen CBM (2007) The Dutch *Salmonella* monitoring programme for pigs and some recommendations for control plans in the future. En Proceedings de 7th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork (SAFEPOK). Verona, Italia, 9-11 de mayo, p. 169-172.

Hanssen EJ (2011) The *Salmonella* monitoring programme in The Netherland. En Proceedings del 9th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork, Maastricht, Países Pajos, 19-22 junio, p. 305-307.

Hernández-Arricibita E (2016) Brote de infecciones por *Salmonella* enterica serovar Typhimurium asociado al consumo de chorizo en Bizkaia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 34(9):577-578.

Hiller A, Schulze-Althoff G, Klein G, Heres L (2011) Meat Juice serology underestimates prevalence of *Salmonella* in pig herds. En Proceedings del 9th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork, Maastricht, Países Pajos, 19-22 junio, p. 269-272.

Horter DC, Yoon KJ, Zimmerman JJ (2003) A review of porcine tonsils in immunity and disease. *Anim Health Res Rev* 4(2):143-155.

Hotes S, Kemper N, Traulsen I, Rave G, Krieter J (2010) Risk factors for *Salmonella* infection in fattening pigs - an evaluation of blood and meat juice samples. *Zoonoses Public Health* 57(1):30-38.

Hurd HS, Stabel TJ, Carlson S (1999) Sensitivity of various fecal sample collections techniques for detection of *Salmonella* typhimurium in finish hogs. En Proceedings del 3th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, EEUU, 5-7 agosto, p. 63-64.

Hurd HS, Gailey JK, McKean JD, Rostagno MH (2001) Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* typhimurium-contaminated environment. *Am J Vet Res* 62(8):1194-1197.

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* 165(7):526-530.

Ivanek R, Österberg J, Gautam R, Sternberg Lewerin S (2012) *Salmonella* Fecal Shedding and Immune Response are Dose- and Serotype- Dependent in Pigs. *PloS One* 7:e34660.

- Jansen A, Frank C, Stark K (2007) Pork and pork products as a source for human salmonellosis in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120(7-8):340-346.
- Köfer J, Kleb U, Pless P (2006) The Styrian *Salmonella* Monitoring Programme for pork production. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53(5):209-212.
- Kostenzer K, Much P, Kornschöber C, Lassnig H, Köfer J (2014) Implementation and results of the EU-wide baseline studies on the prevalence of *Salmonella* spp. in slaughter and breeding pigs in Austria. *Kornschöber Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 127(1-2):35-42.
- Kotunia A, Woliński J, Laubitz D, Jurkowska M, Romé V, Guilloteau P, Zabielski R (2004) Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets fed [correction of feed] by artificial sow. *J Physiol Pharmacol* 55:59-68.
- Kramer TT, Roof MB, Matheson RR (1992) Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella* choleraesuis for vaccination of swine. *Am J Vet Res* 53(4):444-448.
- Krøner S, Alban L, Boes J, Dahl J (2003) Longitudinal Study of *Salmonella* enterica Serotype Typhimurium Infection in Three Danish Farrow-to-Finish Swine Herds. *J Clin Microbiol* 41(6):2282-2288.
- Kuhn KG, Sørensen G, Torpdahl M, Kjeldsen MK, Jensen T, Gubbels S, Bjerager GO, Wingstrand A, Porsbo LJ, Ethelberg S (2013) A long-lasting outbreak of *Salmonella* Typhimurium U323 associated with several pork products, Denmark, 2010. *Epidemiol Infect* 141(2):260-268.
- Larivière-Gauthier G, Thibodeau A, Letellier A, Yergeau É, Fravalo P (2017) Reduction of *Salmonella* Shedding by Sows during Gestation in Relation to Its Fecal Microbiome. *Front Microbiol* 8:2219.
- Li J (2017) Current status and prospects for in-feed antibiotics in the different stages of pork production - A review. *Asian-Australas J Anim Sci* 30(12):1667-1673.
- Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, Kapperud G (2003) DNA fingerprinting of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. *J Clin Microbiol* 41(4):1469-1479.
- Lo Fo Wong DM, Dahl J, Stege H, van der Wolf PJ, Leontides L, von Altrock A, Thorberg BM (2004) Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Prev Vet Med* 62(4):253-266.
- Love BC, Rostagno MH (2008) Comparison of five culture methods for *Salmonella* isolation from swine fecal samples of known infection status. *J Vet Diagn Invest* 20(5):620-624.
- Loynachan T, Harris DL (2005) Dose Determination for Acute *Salmonella* Infection in Pigs. *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2753-2755.
- Lundbeck H, Plazikowski U, Silverstolpe L (1955) The Swedish *Salmonella* outbreak of 1953. *J Appl Bact* 18:535-548.

Luzzi I, Galetta P, Massari M, Rizzo C, Dionisi AM, Filetici E, Cawthorne A, Tozzi A, Argentieri M, Bilei S, Busani L, Gnesivo C, Pendenza A, Piccoli A, Napoli P, Loffredo L, Trinito M O, Santarelli E, Ciofi Degli Atti ML (2007) An Easter outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 104A associated with traditional pork salami in Italy. Euro Surveill 12(4):pii=702.

Lynch H, Leonard FC, Walia K, Lawlor PG, Duffy G, Fanning S, Markey BK, Brady C, Gardiner GE, Argüello H (2017) Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. Prev Vet Med. (Pt A):50-57.

Lynch H, Walia K, Leonard FC, Lawlor PG, Manzanilla EG, Grant J, Duffy G, Gardiner GE, Cormican M, King J, Markey BK, Fanning S, Argüello H (2018) *Salmonella* in breeding pigs: Shedding pattern, transmission of infection and the role of environmental contamination in Irish commercial farrow-to-finish herds. Zoonoses Public Health 65(1):e196-e206.

Maes D, Gibson K, Trigo E, Saszak A, Grass J, Carlson A, Blaha T (2001) Evaluation of cross-protection afforded by a *Salmonella* Choleraesuis vaccine against *Salmonella* infections in pigs under field conditions. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 114(9-10):339-341.

Magistrali CF, D'Avino N, Ciuti F, Cucco L, Maresca C, Paniccià M, Scoccia E, Tentellini M, Pezzotti G (2011) Longitudinal study of fecal *Salmonella* shedding by sows. J Swine Health Prod 19(6):326-330.

Mainar-Jaime RC, Atashparvar N, Chirino-Trejo M, Blasco JM (2008) Accuracy of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Salmonella* spp. in slaughter pigs from Canada. Prev Vet Med 85(1-2):41-51.

Mainar-Jaime RC, Andrés S, Vico JP, San Román B, Garrido V, Grilló MJ (2013) Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 standard method for detection of *Salmonella* spp. on mesenteric lymph nodes from slaughter pigs. J Clin Microbiol 51(1):89-94.

Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM, International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies (2010) The global burden of non typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis 50(6):882-889.

MAPA (2018) Informe del consumo de alimentación en España en 2017. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/images/es/informeanualdeconsumoalimentario2017_tcm30-456186.pdf [Fecha de consulta: 5 febrero 2019].

MAPA (2019a) Indicadores de porcino, cuarto trimestre 2018. Subdirección General de Productos Ganaderos. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/va/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/dashboard4trim2018_tcm39-446162.pdf [Fecha de consulta: 5 febrero 2019].

MAPA (2019b) Estadísticas de producciones ganaderas 2018. Subdirección General de Análisis, Coordinación y Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/boletindiciembre2018-web_tcm30-503512.xls [Fecha de consulta: 5 febrero 2019].

MAPAMA (2018a) Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas en el año 2016. Secretaría General Técnica. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informede-zoonosis2016linea_tcm30-459538.pdf [Fecha de consulta: 5 febrero 2019].

MAPAMA (2018b) El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales indicadores económicos 2017. Subdirección General de Productos Ganaderos. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/va/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicoscarnedecerdo2017comentarios_tcm39-379728.pdf [Fecha de consulta: 15 marzo 2019].

Marier E, Piers Smith R, Ellis-Iversen J, Watson E, Armstrong D, Hogeveen H, Cook AJ (2016) Changes in perceptions and motivators that influence the implementation of on-farm *Salmonella* control measures by pig farmers in England. *Prev Vet Med* 133:22-30.

Martelli F, Lambert M, Butt P, Cheney T, Tatone FA, Callaby R, Rabie A, Gosling RJ, Fordon S, Crocker G, Davies RH, Smith RP (2017) Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in *Salmonella* contaminated pig holdings in the United Kingdom. *PLoS One* 12(6):e0178897.

Martín-Peláez S, Costabile A, Hoyles L, Rastall RA, Gibson GR, La Ragione RM, Woodward MJ, Mateu E, Martín-Orúe SM (2010) Evaluation of the inclusion of a mixture of organic acids or lactulose into the feed of pigs experimentally challenged with *Salmonella* Typhimurium. *Vet Microbiol* 142(3-4):337-345.

Martínez-Avilés M, Garrido-Esteba M, Álvarez J, de la Torre A (2019) *Salmonella* Surveillance Systems in Swine and Humans in Spain: A Review. *Vet Sci* 6(1):20.

Meeusen E, Walker J, Peters A, Pastoret P, Jungersen G (2007) Current Status of Veterinary Vaccines. *Clin Microbiol Rev* 20(3):489-510.

Mejía W, Casal J, Mateu E, Martín M (2005) Comparison of two commercial ELISAs for the serological diagnosis of salmonellosis in pigs. *Vet Rec* 157(2):47-48.

Meriáldi G, Barigazzi G, Bonilauri P, Tittarelli C, Bonci M, D'incau M, Dottori M (2008) Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds. *Zoonoses Public Health* 55(4):222-226.

Méroc E, Strubbe M, Vangroenweghe F, Czaplicki G, Vermeersch K, Hooyberghs J, van der Stede Y (2012) Evaluation of the *Salmonella* surveillance program in Belgian pig farms. *Prev Vet Med* 105(4):309-314.

Methner U, Rammler N, Fehlhaber K, Rösler U (2011) *Salmonella* status of pigs at slaughter--bacteriological and serological analysis. *Int J Food Microbiol* 151(1):15-20.

Missotten J, Michiels J, Degroote J, De Smet S (2015) Fermented liquid feed for pigs: an ancient technique for the future. *J Anim Sci Biotechnol* 6(1):4.

Mooijman KA, Pielaat A, Kuijpers AFA (2019) Validation of EN ISO 6579-1 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1 detection of *Salmonella* spp. *Int J Food Microbiol* 288:3-12.

Mousing J, Jensen PT, Halgaard C, Bager F, Feld N, Nielsen B, Nielsen JP, Bech-Nielsen S (1997) Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev Vet Med* 29(4):247-261.

Mroz Z (2005) Organic Acids as Potential Alternatives to Antibiotic Growth Promoters for Pigs. *Advances in Pork Production* 16:16-182.

Nair S, Farzan A, O'Sullivan TL, Friendship RM (2018) Time course of *Salmonella* shedding and antibody response in naturally infected pigs during grower-finisher stage. *Can J Vet Res* 82(2):139-145.

Nielsen B, Baggesen D, Bager F, Haugegaard J, Lind P (1995) The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examination. *Vet Microbiol* 47(3-4):205-218.

Nielsen B, Ekeröth L, Bager F, Lind P (1998) Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *J Vet Diagn Invest* 10(2):158-163.

Nielsen JP, Jensen B, Wingstrand A (2001) Age related *Salmonella* sero-prevalence in 4-7 months old breeding animals, gilts and sows from Danish breeding and multiplying herds. *En Proceedings del 4th International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. Leipzig, Germany, 2-5 de septiembre, pp. 281-284.

Nollet N, Maes D, Duchateau L, Hautekiet V, Houf K, Van Hoof J, De Zuttera L, De Kruif A, Geers R (2005a) Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet Res* 36(4):545-555.

Nollet N, Houf K, Dewulf J, De Kruif A, De Zutter L, Maes D (2005b) *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Vet Res* 36(4):645-656.

Nygård K, Lindstedt BA, Wahl W, Jensvoll L, Kjelsø C, Mølbak K, Torpdahl M, Kapperud G (2007) Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection traced to imported cured sausage using MLVA-subtyping. *Euro Surveill* 12(11):pii=3158.

Oliveira CJ, Carvalho LF, Garcia TB (2006) Experimental airborne transmission of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiol Infect* 134(1):199-209.

Osterkorn K, Czerny CP, Wittkowski G, Huber M (2001) Sampling plan for the establishment of a serologic *Salmonella* surveillance for slaughter pigs with meat juice ELISA. *Berlinerund Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 114:30-34.

Papenbrock S, Stemme K, Amtsberg G, Verspohl J, Kamphues J (2005) Investigations on prophylactic effects of coarse feed structure and/or potassium diformate on the microflora in the digestive tract of weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 89(3-6):84-87.

Parada J, Carranza AI, Pichel M, Tamiozzo PJ, Pelliza BR, Ambrogi A (2013) *Salmonella* transmission from the gilt to her offspring. *Livest Sci* 157(2-3):604-611.

Parada J, Carranza A, Alvarez J, Pichel M, Tamiozzo P, Busso J, Ambrogi A (2017) Spatial distribution and risk factors associated with *Salmonella* enterica in pigs. *Epidemiol Infect* 145(3):568-574.

Paranthaman K, Haroon S, Latif S, Vinnyey N, de Souza V, Welfare W, Tahir M, Cooke E, Stone K, Lane C, Peters T, Puleston R (2013) Emergence of a multidrug-resistant (ASSuTTm) strain of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT120 in England in 2011 and the use of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis in supporting outbreak investigations. *Foodborne Pathog Dis* 10(10):850-855.

Partanen KH, Mroz Z (1999) Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr Res Rev* 12(1):117-145.

Penmetchsa TV, White BA, Maddox CW, Firkins LD, Weigel RD (2009) Molecular epidemiologic investigation of the role of gilts in the introduction and transmission of *Salmonella* in swine production systems. *J Swine Health Prod* 17(2):81-89.

Peñalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R, Perea A (2005) Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS* 113(1):1-6.

Pires AF, Funk JA, Bolin CA (2013) Longitudinal study of *Salmonella* shedding in naturally infected finishing pigs. *Epidemiol Infect* 141(9):1928-1936.

Pires AF, Funk JA, Bolin C (2014) Risk factors associated with persistence of *Salmonella* shedding in finishing pigs. *Prev Vet Med* 116(1-2):120-188.

Po H, Senozan N (2001) The Henderson-Hasselbalch Equation: Its History and Limitations. *J Chem Educ* 78(11):1499.

Quirke AM, Leonard N, Kelly G, Egan J, Lynch PB, Rowe T, Quinn PJ (2001) Prevalence of *Salmonella* serotypes on pig carcasses from high- and low-risk herds slaughtered in three abattoirs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 114(9-10):360-362.

Rajic A, Keenlside J, McFall ME, Deckert AE, Muckle AC, O'Connor BP, Manninen K, Dewey CE, McEwen SA (2005) Longitudinal study of *Salmonella* species in 90 Alberta swine finishing farms. *Vet Microbiol* 105(1):47-56.

RENAVE (2018) Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2016. Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=25/01/2019-d8ee271b6f> [Fecha de consulta: 1 marzo 2019].

Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3(1):59-67.

Roesler U, Vonaltrock A, Heller P, Bremerich S, Arnold T, Lehmann J, Waldmann KH, Truyen U, Hensel A (2005) Effects of fluorequinolone treatment acidified feed, and improved hygiene measures on the occurrence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in an integrated pig breeding herd. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(2):69-74.

Roesler U, Heller P, Waldmann KH, Truyen U, Hensel A (2006) Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella* typhimurium infection in the offspring. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53(5):224-228.

Rooke JA, Bland IM (2002) The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livest Prod Sci* 78(1):13-23.

Rossi R, Pastorelli G, Cannata S, Corino C (2010) Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets: A review. *Anim Feed Sci Technol* 162(1-2):1-11.

Rostagno MH, Gailey JK, Hurd HS, McKean JD, Leite RC (2005) Culture methods differ on the isolation of *Salmonella* enterica serotypes from naturally contaminated swine fecal samples. *J Vet Diagn Invest* 17(1):80-83.

Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD (2009) Split marketing as a risk factor for *Salmonella* enterica infection in swine. *Foodborne Pathog Dis* 6(7):865-869.

Rostagno MH (2011) Vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in pigs. *Vet Record* 169(21):551-552.

Rostagno MH, Callaway T (2012) Pre-harvest risk factors for *Salmonella* enterica in pork production. Food Res Inter 45(2):634-640.

Roth JA (2011) Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. Procedia Vaccinol 5:127-136.

Ruggeri J, Pesciaroli M, Foresti F, Giacomini E, Lazzaro M, Ossiprandi MC, Corradi A, Lombardi G, Pasquali P, Alborali GL (2015) Inactivated *Salmonella* enterica serovar Typhimurium monophasic variant (*S.* Typhimurium 1,4,[5],12:i-) in sows is effective to control infection in piglets under field condition. Vet Microbiol 180(1-2):82-89.

Rycroft AN (2013) Structure, Function and Synthesis of Surface Polysaccharides in *Salmonella*, p. 20-37. En PA Barrow, U Methner (ed.) *Salmonella* in domestic Animals, 2nd. Ed. CABI International, Oxfordshire, UK.

Sánchez-Rodríguez JA, Navas L, Vinuesa FM, Castells C, Martínez MA, López A, Lindez C, Cabrera-Vique C (2018) New insights on the risk factors associated with the presence of *Salmonella* on pig carcasses. Lessons from small slaughterhouses. Food Control 87:46-52.

Sangvatanakul P (2007) Prevalence of *Salmonella* in piglets and in the fattening period in Chiand Mai, Thailand. Veterinary Public Health, Chiang Mai University and Freie Universität Berlin. Tesis de Máster.

Scherer K, Szabó I, Rösler U, Appel B, Hensel A, Nöckler K (2008) Time course of infection with *Salmonella* typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. J Food Prot 71(4):699-705.

Schultz M (2008) Theobald Smith. Emerg Infect Dis 14(12):1940–1942.

Schut CH, Farzan A, Ainslie-Garcia MH, Friendship RM, Lillie BN (2019) Antibody Responses to *Salmonella* in Pigs from Weaning Up to Marketing and Presence of *Salmonella* at Slaughter. Foodborne Pathog Dis 16(3):187-194.

Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37(1):67-75.

Schwarz P, Kich JD, Kolb J, Cardoso M (2011) Use of an avirulent live *Salmonella* Choleraesuis vaccine to reduce the prevalence of *Salmonella* carrier pigs at slaughter. Vet Rec 169(21):553.

Selke M, Meens J, Springer S, Frank R, Gerlach GF (2007) Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella* enterica serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. Infect Immun 75(5):2476-2483.

Shi J, Zhang G, Wu H, Ross C, Blecha F, Ganz T (1999) Porcine epithelial beta-defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. Infect Immun 67(6):3121-3127.

Shivaprasad HL, Methner U, Barrow PA (2013) *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl, p. 162-192. En P Barrow, U Methner (ed.) *Salmonella* in domestic Animals, 2nd. Ed. CABI International, Oxfordshire, UK.

Si W, Gong J, Chanas C, Cui S, Yu H, Caballero C, Friendship RM (2006) In vitro assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards *Salmonella* serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. J Appl Microbiol 101(6):1282-1291.

SIM (2017) Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2016. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto Carlos III, Madrid. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-sistema-informacion-microbiologica/pdf_2018/Informe_Anual_SIM_2016.pdf [Fecha de consulta: 10 febrero 2019].

Smith RP, Andres V, Martelli F, Gosling B, Marco-Jimenez F, Vaughan K, Tchorzewska M Davies R (2017) Maternal vaccination as a *Salmonella* Typhimurium reduction strategy on pig farms. J Appl Microbiol 124(1):274-285.

Snary EL, Munday DK, Arnold ME, Cook AJ (2010) Zoonoses action plan *Salmonella* monitoring programme: an investigation of the sampling protocol. J Food Prot 73(3):488-494.

Snary EL, Swart AN, Simons RR, Domingues AR, Vigre H, Evers EG, Hald T, Hill AA (2016) A Quantitative Microbiological Risk Assessment for *Salmonella* in Pigs for the European Union. Risk Anal 36(3):437-449.

Sørensen LL, Alban L, Nielsen B, Dahl J (2004) The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. Vet Microbiol 101(2):131-141.

Stevens MP, Gray JT (2013) *Salmonella* Infections in Pigs, p 263-294. En P Barrow, U Methner (ed.) *Salmonella* in domestic Animals, 2nd. Ed. CABI International, Oxfordshire, UK.

Strockbine N, Bopp C, Fields P, Kaper J, Nataro J (2015) *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*, p. 685-713. En J Jorgensen, M Pfaller, K Carroll, G Funke, M Landry, S Richter, D Warnock (ed.) Manual of Clinical Microbiology, 11th. Ed. ASM Press, Washington, DC, USA.

Swanenburg M, Berends BR, Urlings HA, Snijders JM, van Knapen F (2001) Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 114(9-10):356-359.

Swart A, Simons R, Evers E, Snary E, Swanenburg M (2016) Modeling of *Salmonella* contamination in the pig slaughterhouse. Risk Analysis 36(3):498-515.

Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M (2009) Emergence, Distribution, and Molecular and Phenotypic Characteristics of *Salmonella* enterica Serotype 4,5,12:i:-. Foodborne Pathog Dis 6(4):407-415.

van der Wolf PJ, Bongers JH, Elbers AR, Franssen FM, Hunneman WA, van Exsel AC, Tielen MJ (1999) *Salmonella* infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. *Vet Microbiol* 67(4):263-75.

van der Wolf PJ, Lo Fo Wong DM, Wolbers WB, Elbers AR, van der Heijden HM, van Schie FW, Hunneman WA, Willeberg P, Tielen MJ (2001) A longitudinal study of *Salmonella* enterica infections in high-and low-seroprevalence finishing swine herds in The Netherlands. *Vet Q* 23(3):116-121.

van der Wolf PJ (2017) Programa de monitorización de *Salmonella* en porcino en los Países Bajos. Disponible en: <https://www.3tres3.com/articulos/programa-de-monitorizacion-de-Salmonella-en-porcino-en-paises-bajos> 38512/ [Fecha de consulta: 15 de febrero 2019].

Van Immerseel F, Boyen F, Gantois I, Timbermont L, Bohez L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R (2005) Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult Sci* 84(12):1851-1856.

van Winsen RL, van Nes A, Keuzenkamp D, Urlings HA, Lipman LJ, Biesterveld S, Snijders JM, Verheijden JH, van Knapen F (2001) Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. *Vet Microbiol* 80(3):267-274.

Vico JP, Engel B, Buist WG, Mainar-Jaime RC (2010) Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. *Zoonoses Public Health* 57(Suppl 1):107-114.

Vico JP, Mainar-Jaime RC (2011a) The use of meat juice or blood serum for the diagnosis of *Salmonella* infection in pigs and its possible implications on *Salmonella* control programs. *J Vet Diagn Invest* 23(3):528-531.

Vico JP, Rol I, Garrido V, San Román B, Grilló MJ, Mainar-Jaime RC (2011b) Salmonellosis in finishing pigs in Spain: prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. *J Food Prot* 74(7):1070-1078.

Vico JP, Mainar-Jaime RC (2012) Serological survey of *Salmonella* spp. infection in finishing pigs from northeastern Spain and associated risk factors. *SJAR* 10(2):372-382.

Vieira-Pinto M, Tenreiro R, Martins C (2006) Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 110(1):77-84.

Vigre H, Barfoed K, Swart AN, Simons RR, Hill AA, Snary EL, Hald T (2016) Characterization of the Human Risk of Salmonellosis Related to Consumption of Pork Products in Different E.U. Countries Based on a QMRA. *Risk Anal* 36(3):531-545.

Wales AD, Cook AJ, Davies RH (2011) Producing *Salmonella*-free pigs: a review focusing on interventions at weaning. *Vet Rec* 168(10):267-276.

Wales A, Davies RH (2013) Environmental Aspects of *Salmonella*, p. 399-425. En P Barrow, U Methner (ed.) *Salmonella* in domestic Animals, 2nd. Ed. CABI International, Oxfordshire, UK.

Wales AD, Davies RH (2017) *Salmonella* Vaccination in Pigs: a Review. *Zoonoses Public Health* 64(1):1-13.

Walia K, Argüello H, Lynch H, Leonard FC, Grant J, Yearsley D, Kelly S, Duffy G, Gardiner GE, Lawlor PG (2016) Effect of feeding sodium butyrate in the late finishing period on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Prev Vet Med* 131:79-86.

Walia K, Argüello H, Lynch H, Leonard FC, Grant J, Yearsley D, Kelly S, Duffy G, Gardiner GE, Lawlor PG (2017a) Effect of strategic administration of an encapsulated blend of formic acid, citric acid, and essential oils on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Prev Vet Med* 137(Pt A):28-35.

Walia K (2017b) Targeted low cost strategies to combat *Salmonella* spp. in finisher pigs in the slaughterhouse. Waterford Institute of Technology (Teagasc). Dublin. Tesis Doctoral.

Waltman (2000) Methods for the Cultural Isolation of *Salmonella*, p. 355-372. En Wray C and Wray A (ed.) *Salmonella* in domestic Animals, 1st. Ed. CABI International, Oxfordshire, UK.

Wang S, Wang J, Mou H, Luo B, Jiang X (2015) Inhibition of adhesion of intestinal pathogens (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* Typhimurium) by common oligosaccharides. *Foodborne Pathog Dis* 12(4):360-365.

WHO (1983) Guidelines on prevention and control of salmonellosis. Ed. Linton AH. Geneva. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66402/VPH_83.42_\(p1-p66\).pdf?](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66402/VPH_83.42_(p1-p66).pdf?) [Fecha de consulta: 1 de marzo 2019].

WHO (2018) *Salmonella* (non-typhoidal): key facts. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-(non-typhoidal)) [Fecha de consulta: 1 febrero 2019].

Wierup M (2006) The Swedish *Salmonella* control in primary production – an overview of its background, strategy and development. En Proceedings de *Salmonella* Workshop – control in poultry from feed to farm. National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden, 13-17 March 2006, p. 11-14.

Wilhelm B, Rajić A, Parker S, Waddell L, Sanchez J, Fazil A, Wilkins W, McEwen SA (2012) Assessment of the efficacy and quality of evidence for five on-farm interventions for *Salmonella*

reduction in grow-finish swine: a systematic review and meta-analysis. *Prev Vet Med* 107(1-2):1-20.

Wilkins W, Rajić A, Parker S, Waddell L, Sanchez J, Sargeant J, Waldner C (2010) Examining heterogeneity in the diagnostic accuracy of culture and PCR for *Salmonella* spp. in swine: a systematic review/meta-regression approach. *Zoonoses Public Health* 57 (Suppl 1):121-134.

Wójcik OP, Kjelsø C, Kuhn KG, Müller L, Jensen T, Kjeldsen MK, Ethelberg S (2012) *Salmonella* Typhimurium outbreak associated with smoked pork tenderloin in Denmark, January to March 2011. *Scand J Infect Dis* 44(12):903-908.

VIII. ANEXOS

I. Protocolo de la técnica PGFE

En el presente anexo se resumen las etapas de la técnica de PGFE seguida en esta Tesis Doctoral (Ribot *et al.*, 2006):

1ª) Preparación del cultivo puro de *Salmonella*: el objetivo es obtener DNA fresco.

2ª) Preparación de los bloques bacterianos en agarosa: el objetivo es proteger el ADN de la degradación enzimática y mecánica del proceso. Para ello, se prepara una solución con una suspensión bacteriana, para que el ADN quede inmovilizado en la agarosa tras la lisis celular.

3ª) Lisis del ADN en los bloques de agarosa: una vez preparados los bloques de agarosa con las bacterias completas, deben estar expuestos al buffer de lisis con proteinasa k, que mediante la acción combinada de temperatura (54 °C) más agitación (1,5 horas), provocará la rotura de las bacterias y la liberación de su ADN.

4ª) Lavados: tras el proceso de lisis bacteriana y decantación del buffer sobrante, se debe proceder con cuatro lavados con TE Buffer (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0).

5ª) Digestión con enzimas de restricción: se pone en contacto el bloque de agarosa con la enzima de restricción. De las más empleadas, para esta Tesis Doctoral se ha usado la enzima de restricción XbaI, que reconoce la secuencia T/CTAGA del ADN bacteriano.

6ª) Proceso de electroforesis de gel en campo pulsado: el método utilizado fue el CHEF (*Contour-clamped Homogeneous Electric Field electrophoresis*), con un sistema de 24 electrodos colocados en forma hexagonal, produciendo un gradiente de voltaje constante a lo largo de todo el gel y manteniendo una temperatura constante de 14 °C, para evitar afectar a la resolución de los fragmentos de ADN.

7ª) Elaboración de los dendrogramas: se utilizó el software BioNumerics (version 6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) para el estudio de los grados de similitud entre dos cepas, mediante el coeficiente de DICE, basado en el número de bandas comunes entre dos patrones de restricción. El algoritmo matemático empleado para elaborar los dendrogramas es el método de agrupación por pares no ponderado, utilizando promedios (*unweighted pair group method using arithmetic averages*: UPGMA).

IX. APÉNDICES

1. Características de las revistas científicas

En este apéndice se muestran el Factor de Impacto y el cuartil en el que se sitúan, dentro de cada área temática, las distintas revistas en las que se han publicado los artículos de esta Tesis Doctoral. El Factor de Impacto hace referencia al del año de publicación o al último disponible. Todos los parámetros se han obtenido del *Journal Citation Reports*® disponible en la página web de *ISI Web of Knowledge*.

- **Publicación I:** publicado en 2017.
 - Revista: Zoonoses and Public Health.
 - Área temática: Veterinary Sciences (Q1, posición 6/140) e Infectious Diseases (Q2, posición 43/88).
 - Factor de Impacto: 2,688.
 - Numero de citas: 6.

- **Publicación II:** publicado en 2018.
 - Revista: Zoonoses and Public Health.
 - Área temática (año 2017): Veterinary Sciences (Q1, posición 6/140) e Infectious Diseases (Q2, posición 43/88).
 - Factor de Impacto (año 2017): 2,688.
 - Numero de citas: 1.

- **Publicación III:** publicado en 2017.
 - Revista: Animal Feed Science and Technology.
 - Área temática: Agriculture, Dairy and Animal Science (Q1, posición 6/60).
 - Factor de Impacto: 2,143.
 - Numero de citas: 2.

- **Publicación IV:** publicado en 2018.
 - Revista: Spanish Journal of Agricultural Research.
 - Área temática (año 2017): Agricultural and Biological Sciences: Agronomy and Crop Science (Q2, posición 130/309) y Agriculture/Multidisciplinary (Q3, posición 29/56).

- Factor de Impacto (año 2017): 0,811.
 - Numero de citas: 0.
- **Publicación V:** en revisión.
- Revista: Veterinary Research.
 - Área temática (año 2017): Veterinary Sciences (Q1, posición: 4/140).
 - Facto de Impacto (año 2017): 2,903.
 - Número de citas: N/A.

2. Contribuciones del Doctorando

D. RAÚL CARLOS MAINAR JAIME, Doctor en Veterinaria, con DNI 25.147.495-P, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza y D^a. CLARA MARÍA MARÍN ALCALÁ, Doctora en Veterinaria, con DNI 17.865.348-Y, Investigadora de la Unidad de Producción y Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA), ambos Directores de la presente memoria presentada por D. Alejandro Casanova Higes para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza,

INFORMAN

Que D. Alejandro Casanova Higes ha participado activamente en la ejecución de todos los experimentos presentados en las publicaciones incluidas en esta Tesis Doctoral. La contribución del Doctorando ha consistido tanto en la toma de muestras en las explotaciones ganaderas y mataderos como en los correspondientes análisis microbiológicos, serológicos y moleculares de las mismas, además del análisis estadístico de los resultados y en la escritura y revisión de los manuscritos correspondientes.

Para que así conste, lo hacemos firmar como Directores de la Tesis en Zaragoza, a 29 abril 2019.

Fdo: Raúl C. Mainar Jaime

Fdo: Clara M^a. Marín Alcalá

3. Otras contribuciones científicas

Publicaciones incluidas en el Journal of Citation Reports (ISI)

1. Shivdeep Singh Hayer, Alejandro Casanova Higes, Eliana S. Paladino, Ehud Elnekave, Timothy J. Johnson, Jeff B. Bender, Peter Davies, Andre Nault, Andres Perez, Julio Alvarez, 2019. Global prevalence and trends of extended spectrum cephalosporin, carbapenem and colistin resistance in *Escherichia coli* of swine origin - a systematic review and metaanalysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (en revisión).

Publicaciones de divulgación, no incluidas en el Journal of Citation Reports (ISI)

1. Raúl C. Mainar Jaime, Alejandro Casanova Higes, 2018. La vacunación frente a *Salmonella* en ganado porcino, ¿qué podemos esperar? Revista on-line *3tres3*. Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/la-vacunacion-frente-a-salmonella-en-ganado-porcino_40199/ [Fecha de consulta: 20 de marzo 2019].

Realización de Estancias de Investigación

1. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, el Doctorando ha realizado una estancia de investigación en el *Veterinary Population Medicine Department* de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Minnesota (EEUU). La duración fue de 5 meses (21 de mayo – 17 de octubre 2017) y el tutor responsable durante la estancia fue el Profesor Julio Álvarez.

Premios otorgados

1. Premio a la mejor comunicación oral en el V Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios de Porcino de Aragón, celebrado en noviembre de 2016 en Córdoba, España.

Impartición de Seminarios de investigación

1. *"Salmonelosis porcina: un problema en Salud Pública"*. II Ciclo de Conferencias del Aula Porcina, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. 13 de mayo 2019.
2. *"Salmonella in swine: epidemiology and control strategies"*. Swine Seminar series, Veterinary Population Medicine Department, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Minnesota (EEUU). 6 de octubre de 2017.
3. *"Salmonelosis porcina: estadísticas del sector y epidemiología de la infección"*. Departamento de Producción y Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). 16 de abril de 2016.

Contribuciones a congresos internacionales

1. Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M., Ruiz-Palacín, M., Mainar-Jaime, R.C., 2018. The use of organic acids at lairage and its effect on pig *Salmonella* shedding at slaughter. 25th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), China. Comunicación oral.
2. Mainar-Jaime, R.C., Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Vico, J.P., 2017. Revisiting the role of pig serology in the context of *Salmonella* control programs in countries with high prevalence of infection-a preliminary study. XI Congreso Internacional Safepork, Brasil. Comunicación oral.
3. Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C., 2017. Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigs. XI Congreso Internacional Safepork, Brasil. Póster científico.
4. Puyalto, M., Sol, C., Mallo J.J., Andrés-Barranco, S., Casanova-Higes, A., Mainar-Jaime, R.C., 2016. Effect of protected sodium butyrate on *Salmonella* spp. shedding in a pig fattening unit. Joint Annual Meeting of the American Society of Animal Science (ASAS), EEUU. Comunicación oral.
5. Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Marín-Alcalá, C.M., Mainar-Jaime, R.C., 2016. *Salmonella* spp. infection in piglets from *Salmonella*-positive breeding holdings. 24th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Irlanda. Comunicación oral.

6. Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C., 2015. Relationship between *Salmonella* shedding at the slaughter and pig *Salmonella* status during the fattening period. X Congreso Internacional Safepork, Portugal. Comunicación oral.

Contribuciones a congresos nacionales

1. Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C., 2018. ¿Nuevo enfoque de los programas de control de *Salmonella* en producción porcina? VI Congreso de la Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino (ANAVEPOR), Zaragoza. Comunicación oral.
2. Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C., 2018. ¿Nuevo enfoque de los programas de control de *Salmonella* en producción porcina? II Encuentro de Investigadores IA2, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. Comunicación oral.
3. Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., Mainar-Jaime, R.C., 2016. Salmonelosis porcina: importancia del estatus de infección del cerdo en la contaminación del matadero. V congreso de la Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino (ANAVEPOR), Córdoba, España. Comunicación oral y póster científico. Premio a la mejor comunicación oral.

Participación en contratos/convenios de investigación con empresas y/o administraciones públicas

1. Contrato CDTI: Desarrollo de estrategias para la reducción de la prevalencia y presión de infección ambiental de *Salmonella* en cerdos de engorde.
Entidades participantes: Sociedad Cooperativa Ganadera de Caspe S.L., Universidad de Zaragoza y CITA-Aragón.
Duración: de 30/06/2018 a 15/10/2020.
Responsable: Raúl C. Mainar Jaime.
2. Grupo de Desarrollo de Investigación “Zoonosis Bacterianas: Brucelosis-Salmonelosis (ZooBac)”.
Entidades participantes: CITA-Aragón.

Duración: 1/01/2017 a 31/12/2019.

Responsable: Pilar M. Muñoz Álvaro.

3. Proyecto RTA-INIA: Reducción del uso de antibióticos en producción ganadera intensiva: programa integral de manejo y aplicación de productos alternativos.

Entidades participantes: CITA-Aragón.

Duración: de 20/06/2017 a 26/12/2018.

Responsable: Clara M^a. Marín Alcalá.

4. Contrato de I+D: El control de enfermedades entéricas de etiología bacteriana en el periodo de transición en ausencia de antibióticos.

Entidades participantes: NOREL S.A., Universidad de Zaragoza y CITA-Aragón.

Duración: de 01/12/2017 a 31/07/2018.

Responsable: Raúl C. Mainar Jaime.

5. Contrato de I+D: Eficacia del uso de ácidos orgánicos en el agua de bebida de las salas de espera del matadero para reducir la excreción de *Salmonella* de los cerdos sacrificados.

Entidades participantes: FRIBIN S.A., Universidad de Zaragoza y CITA-Aragón.

Duración: de 01/11/2016 a 30/06/2017.

Responsable: Raúl C. Mainar Jaime.

6. Contrato de I+D: El control de enfermedades entéricas de etiología bacteriana en el periodo de transición y antes del sacrificio.

Entidades participantes: MOLIMEN S.L., Universidad de Zaragoza y CITA-Aragón.

Duración: de 01/11/2016 a 30/06/2017.

Responsable: Raúl C. Mainar Jaime.

7. Contrato de I+D: Control de la salmonelosis porcina mediante la adición de Dicosan+® en cerdos de cebo.

Entidades participantes: NOREL S.A., Universidad de Zaragoza y CITA-Aragón.

Duración: de 01/11/2016 a 30/06/2017.

Responsable: Raúl C. Mainar Jaime.

8. Contrato de I+D: Control de la salmonelosis porcina mediante la adición de Salmosan® en reproductoras.

Entidades participantes: AGROPIENSO S.C.L., Universidad de Zaragoza y CITA-Aragón.

Duración: de 01/10/2016 a 28/02/2017.

Responsable: Raúl C. Mainar Jaime.

9. Grupo Consolidado de Investigación "*Brucellosis-Salmonellosis*".

Entidades participantes: CITA-Aragón.

Duración: 1/01/2015 a 31/12/2016.

Responsable: José M. Blasco Martínez.

10. Proyecto RTA-INIA: Control de la salmonelosis porcina en cebadero: papel de los lechones como transmisores de la infección y eficacia de la adición de extractos naturales de plantas al pienso.

Entidades participantes: Universidad de Zaragoza y CITA-Aragón.

Duración: 13/05/2013 a 13/05/17.

Responsable: Raúl C. Mainar Jaime y Clara M^a. Marín Alcalá.

Experiencia docente universitaria

Codirección de Trabajos Final de Grado de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

- Nombre del alumno: Mario Ruíz Palacín.
Título: Reducción de la excreción de *Salmonella* spp. en cerdos antes del sacrificio en matadero.
Fecha de defensa: convocatoria de junio 2018.
Calificación: Notable (8,5).
- Nombre del alumno: Sergio López Lanau.
Título: Control de la salmonelosis en el periodo de transición.
Fecha de defensa: convocatoria de junio 2018.
Calificación: Matrícula de Honor (9,4).

- Nombre del alumno: Daniel Bordes Aguarón.

Título: Control de la salmonelosis porcina mediante la adición de Dicosan +[®] en la dieta de cerdos de engorde.

Fecha de defensa: convocatoria diciembre 2017.

Calificación: Notable (8).

- Nombre del alumno: María Bernad Roche.

Título: Control de la salmonelosis porcina en maternidades mediante la adición de manano oligosacáridos en la alimentación de las madres.

Fecha de defensa: convocatoria junio 2017.

Calificación: Sobresaliente (9,0).

- Nombre del alumno: Beatriz Miguelena Chamorro.

Título: Determinación de la prevalencia de *Salmonella* spp. en lechones en Aragón.

Fecha de defensa: convocatoria de junio 2016.

Calificación: Sobresaliente (9,0).

Codirección del Trabajo de Fin Diplomatura en Salud Pública del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS):

- Nombre del alumno: Raúl Hernández Palacios.

Título: Efecto de la adición de una mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida en corrales de matadero en la excreción de *Salmonella* en matadero.

Fecha de defensa: 1 de octubre 2018.

Calificación: Apto.

4. Renuncia de los coautores de los trabajos presentados.



Escuela de Doctorado
Universidad Zaragoza

RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Cebollada Solanas	Nombre: Alberto	
DNI/Pasaporte/NIE: 25189369E	Teléfono 627029428	Correo electrónico alberto@unizar.es

2.- Tesis Doctoral
Título: Avances en la epidemiología de la salmonelosis porcina y estrategias de control asociadas
Autor: Alejandro Casanova Higes
Programa de doctorado: Medicina y Sanidad Animal

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor
<p>Alejandro Casanova Higes, Clara M^a Marín Alcalá, Sara Andrés Barranco, Alberto Cebollada Solanas, Julio Álvarez, Raúl C. Mainar Jaime (2019) Weaned piglets: another key factor for the control of Salmonella infection in breeding pig farms. Revista: Veterinary Research (pendiente de aceptación).</p>

RENUNCIA:	
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.	
<p><lugar>, <fecha> Zaragoza 12 de abril de 2019</p>	<p>CEBOLLADA SOLANAS ALBERTO - 25189369E</p> <p>Firma:</p> <p><small>Firmado digitalmente por CEBOLLADA SOLANAS ALBERTO - 25189369E. Número de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-25189369E, givenName=ALBERTO, sn=CEBOLLADA SOLANAS, email=CEBOLLADA.SOLANAS.ALBERTO-25189369E. Fecha: 2019.04.12 12:39:15 +02'00'</small></p>

De acuerdo con lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/99, de Protección de datos de carácter personal, le informamos que sus datos pasan a formar parte del fichero de estudiantes, cuya finalidad es la gestión académica y administrativa así como la gestión de su participación en los servicios de la UZ. Puede ejercer los derechos de acceso, rectificación y cancelación de sus datos remitiendo un escrito al Sr. Gerente.

AGRADECIMIENTOS

Estas páginas están escritas para agradecer a toda la gente que me ha acompañado durante estos años en la realización de mi Tesis Doctoral. El camino ha sido largo, pero gracias a vosotros he disfrutado desde el primer día hasta el último. Os pido perdón por adelantado si me dejo a alguno de vosotros por nombrar.

En primer lugar, a mi dos Directores de Tesis, Raúl Mainar y Clara Marín. Realmente no tengo palabras para poder expresar todo lo que me habéis ayudado y apoyado durante estos cuatro años. El fruto final ha sido una Tesis Doctoral, pero me brindasteis una oportunidad que solo sabré apreciar dentro de muchos años cuando mire hacia atrás y vea todo el camino recorrido. Habéis sido jefes, pero también compañeros. Raúl, muchas gracias por tus consejos y todos los ánimos que me has dado en la multitud de situaciones en las que los he necesitado. Gracias a los dos por no ponerme ningún “no” en el camino.

También quiero tener un especial reconocimiento al resto del *Salmonella Team*, Juan Pablo y Sara Andrés. A JP porque, aunque no coincidimos casi temporalmente en el CITA, fuiste la base de muchas investigaciones en *Salmonella* que más tarde hemos continuado. Todavía hoy escucho la frase de “Juan Pablo lo hacía así”. Y a ti, Sara, por haberme enseñado todo lo que he necesitado estos años, por toda tu ayuda desinteresada desde el primer día que pisé el laboratorio; has sido la mejor compañera que he podido tener.

Me gustaría agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España por la beca Pre-Doctoral FPI-INIA que me ha permitido desarrollar esta Tesis Doctoral, junto al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA), por permitirme desarrollar este proyecto en sus instalaciones.

Un infinito agradecimiento a todos los compañeros del CITA con los que he tenido la oportunidad de compartir momentos durante estos 4 años. A Pablo Rufino, porque comenzamos a la vez y terminaremos juntos, compañero de confesiones y fatigas inolvidables, aquí y allá; me llevo un amigo. También a Juanra, Andrés, Agustí y Claudia, por todos los “*si no fuera por estos momentos...*”. Os echaré de menos, aunque algo me dice que nos seguiremos viendo.

A toda la gente del I+D, que me habéis ido dando fuerzas todos los días y hemos compartido cafés, comidas y cenas, ese buen ambiente que ha envuelto todo este tiempo y ha hecho más fácil el día a día. A las compañeras de la sala de becarios, Laura I. y Olaia por todo

vuestro apoyo, trucos y consejos como antiguas becarias. Al resto de investigadores del Grupo *Salmonella-Brucella*, Chus, Pili y Chema por ayudarme en todo lo que os pedía, y especialmente a las chicas de P3, Sara Serrano y María Uriarte, por vuestra sonrisa. A Albertico, por alegrarme todas las mañanas. A Elías, por tus ánimos. A las Pilares, Sarto e Hijazo, las jefas del laboratorio. Al resto de compañeros del Departamento, Elena, Jorge, Mapi, Teresa, Calvete, Belén, Piluca, Alabart, Folch, Ana, Mari Cruz, Carlos, Lucía y muchos más que seguro me olvido. A los antiguos becarios de la Casa Amarilla, en especial a Tamara, Sandra, José Antonio y Carolina, por todos vuestros consejos y los buenos ratos fuera del trabajo. Y a los nuevos, Kenza, Karina y Enrique, mucho ánimo en vuestra Tesis. Y, en general, a todos los integrantes de la Unidad de Producción y Sanidad Animal con los que en algún momento me he cruzado por el camino.

También quería agradecer a todas las empresas del sector que han participado en el desarrollo de las investigaciones, como han sido las empresas de producción porcina, de nutrición animal, integradoras, mataderos, explotaciones, veterinarios y empleados de las granjas que han colaborado en los ensayos, sin su ayuda y colaboración los proyectos no habrían salido adelante.

Me gustaría tener un especial agradecimiento al Profesor Julio Álvarez, por darme la excelente oportunidad de realizar una estancia de investigación en el *College of Veterinary Medicine* de la Universidad de Minnesota. También al resto de investigadores del *Swine Group*, ya que hicieron que me sintiera como en casa, en concreto a Carles, Eliana, Sol y tantos otros que sería interminable nombrarlos y seguro me olvidaría de alguno. Me llevo unos recuerdos inolvidables de mi estancia en EEUU que no hubieran sido posibles sin vosotros. Y especialmente a Roger, un excelente veterinario y amigo, por el apoyo mutuo y descubrir juntos las Twin Cities.

I would like to thank Prof. Julio Álvarez for giving me the opportunity to perform a training stay in the College of Veterinary Medicine in the University of Minnesota. Also to the rest of the scientists of the *Swine Group* that I met during my stay because they made me feel at home, with an especial mention to Carles, Eliana, Sol and so many others that would be endless to name them all and I would surely forget any. I bring some unforgettable memories of my stay in the USA that would not have been possible without all of you. In addition to Roger, a wonderful vet and mate, for your support and discovering the Twin Cities together.

De igual manera quería tener un reconocimiento a todos los estudiantes del Grado en Veterinaria y CTA de la Universidad de Zaragoza, que se prestaron voluntarios para ayudarnos en los ensayos y a los que decidieron hacer su TFG con nosotros. Y también en especial a la

Profesora Mariví Falceto, que como recordarás una llamada telefónica tuya en 2014 fue clave para que hoy esté escribiendo estas líneas.

Al Departamento de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza, en especial a Alberto Cebollada y Sofía Samper, por su ayuda con los análisis de Campo Pulsado.

Al Laboratorio Nacional de Referencia para la Salmonelosis Animal de Algete, en especial a Cristina de Frutos, por su colaboración en la serotipificación de las muestras de *Salmonella*.

Agradecer a los compañeros de DM2 y ENA por su confianza y nunca haberse olvidado de mí durante estos años. Por el futuro que nos espera.

Agradecer a mis amigos de Zaragoza, en especial a Javier, David, Rubén y Alberto de Agustinos, por todos los buenos ratos vividos (y los que vendrán) y por sus enormes inquietudes sobre la Veterinaria durante los fines de semana.

También a mis amigos de la Facultad de Veterinaria. A los del *Clan*, Zamora, Brahyan, Deivid, Javi, Jordi, Juan, Ibarra, Kyla, Lorena, Marga, Maje, Mayte, Miriam, Oriol, Pau, Selene, Sergio, Tamara, Txema, Myriam y Vicente. Volvería atrás en el tiempo para volver a vivir todo lo que hemos disfrutado juntos. Nos quedan las quedadas y esas inolvidables calçotadas. Y a *Mis vets*, Alberto, Diana, Haizea, Mar, Rakel y Vero. Los años de Universidad fueron inolvidables gracias a todos vosotros.

Por último, quería agradecer a toda mi familia por el apoyo que me habéis dado estos años. A mi prima Clara por su ayuda con la traducción de la Tesis y a mi tía Carmen por sus correcciones. A mi hermano, Alberto, que pese a la distancia siempre buscamos como juntarnos para disfrutar de una buena mesa. A María José, por ser una madre excelente y darlo todo por mí. Y para terminar a mi padre, Antonio, a su memoria, a la que va dedicada esta Tesis Doctoral, por ser el referente de mi vida.